

Aus dem Institut für Weinchemie und Getränkeforschung
der Hessischen Lehr- und Forschungsanstalt in Geisenheim

Die Acetaldehydbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit vom Gärsubstrat

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Ernährungswissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Dipl. oec. troph. Gisela Semmler
aus Laubach/Oberhessen

Gießen 1971

Aus dem Institut für Weinchemie und Getränkeforschung
der Hessischen Lehr- und Forschungsanstalt in Geisenheim

Die Acetaldehydbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit vom Gärsubstrat

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Ernährungswissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Dipl. oec. troph. Gisela S e m m l e r
aus Laubach/Oberhessen

Gießen 1971



Dekan: Prof. Dr. Linser

1. Berichterstatter Prof. Dr. Wucherpennig
2. Berichterstatter Prof. Dr. Cremer

Tag der mündlichen Prüfung: 6.8.1971

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Wucherpfennig ganz herzlich für die Überlassung dieser Arbeit danken und dafür, daß er mir die Durchführung der Versuche in seinem Institut ermöglichte, mir wertvolle Ratschläge gab und die Arbeit in jeder Beziehung gefördert hat.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Cremer für die Übernahme des Korreferates.

Auch möchte ich es nicht versäumen, mich bei dem Institut für Mikrobiologie, dem Institut für Kellerwirtschaft an der Hessischen Lehr- und Forschungsanstalt in Geisenheim sowie der Brauerei Ihring Melchior in Lich dafür zu bedanken, daß sie mir so großzügig Versuchsmaterial zur Verfügung gestellt haben.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung und Problemstellung</u>	5
1.1. Vorkommen und Aufgabe der SO_2	5
1.2. Bedenklichkeit der SO_2	6
1.3. SO_2 und Acetaldehyd	8
1.4. SO_2 -Gehalt verschiedener Weine	10
2. <u>Literaturangaben über die Bildung von Acetaldehyd während der Gärung</u>	11
2.1. Acetaldehydbildung im Verlauf der Gärung	11
2.1.1. Entstehung des Acetaldehyds	11
2.1.1.1. Glykolyse	13
2.1.1.2. ATP-Bilanz	14
2.1.1.3. NAD-Bilanz	17
2.1.2. Gärungsphasen	17
2.1.2.1. Aerobe Phase	18
2.1.2.2. Übergangsphase	21
2.1.2.3. Anaerobe Phase	22
2.2. Acetaldehyd in Abhängigkeit vom Substrat und den Gärbedingungen	24
2.2.1. Glucosekonzentration	24
2.2.2. Hefe	25
2.2.3. Temperatur	26
2.2.4. Enzymaktivität	27
2.2.5. Belüftung	29

	Seite
2.3. Acetaldehyd in Abhängigkeit von der Kellertechnik	30
2.3.1. Maischeschwefelung	30
2.3.2. Gärstopp	31
2.3.3. Gärung unter Druck	32
2.3.4. Nachgärung	34
2.3.5. Hochkurzzeiterhitzung	34
2.3.6. Maischebewegung	35
2.3.7. Gefäßverschluß	36
3. <u>Eigene Versuche über die Bildung und den Abbau von Acetaldehyd im Verlauf der Gärung</u>	36
3.1. Material und Methoden	36
3.1.1. Material	36
3.1.2. Methoden	37
3.2. Einfluß der Polyphenole auf die Gärung und den Gehalt an Acetaldehyd	42
3.3. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Acetaldehydbildung	59
3.4. Einfluß der Substratvitaminierung auf die Acetaldehydbildung	73
3.4.1. Einfluß der Vitaminierung in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration	85
3.4.2. Einfluß einzelner Vitamine bei konstantem pH-Wert	93
3.5. Abhängigkeit der Gärung von den Stickstoffquellen im Substrat	102
3.6. Einfluß von Schönungsmitteln auf den Acetaldehydgehalt im Substrat	113

	Seite
3.6.1. Stabilisierung mit Bentonit	113
3.6.2. Kohleschönung	116
3.6.3. Gelatine-Kieselsolschönung	118
4. <u>Gewinnung von Enzymen zum Acetaldehydabbau</u>	119
4.1. Material und Methoden	121
4.1.1. Material	121
4.1.2. Methoden	122
4.1.2.1. Mikroorganismenzüchtung	122
4.1.2.2. Aufarbeitung der Kulturen	123
4.1.2.3. Aktivitätsbestimmungen	126
4.2. Ergebnisse der Versuche zum Acetaldehydabbau mit verschiedenen Enzymen unter verschiedenen Bedingungen	128
4.2.1. Acetaldehydabbau mit ADH und NADH	128
4.2.2. Acetaldehydabbau mit Aldehyd Dehydrogenase aus Hefe	130
4.2.2.1. pH-Einfluß auf die Aktivität	130
4.2.2.2. Einfluß des Hefealters auf die Aktivität	132
4.2.3. Enzyme aus Mucor racemosus	135
4.2.3.1. Ergebnisse mit Rohextrakten	135
4.2.3.2. Einfluß der Reinigung auf die Aktivität	137
4.2.4. Enzyme aus Bierhefe	143
4.2.5. Die Wirkung verschiedener Enzyme auf den Äthanol- und den Acetaldehydgehalt einer Modelllösung	145
4.2.6. Enzym aus Aspergillus niger	151

	Seite
5. <u>Zusammenfassung</u>	163
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	173

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Vorkommen und Aufgabe der SO_2

Die Verwendung von SO_2 bei der Weinbereitung war schon Römern und Griechen bekannt. Im Mittelalter war die SO_2 zur Haltbarmachung vieler Lebensmittel weit verbreitet und gehört auch heute zu den meistgebrauchten technischen Hilfsstoffen (19). Das Ziel jedes SO_2 -Zusatzes ist ein Ausschalten unerwünschter Veränderungen. Sie wird gegen mikrobiellen Verderb, zum Ausschalten enzymatischer und nichtenzymatischer Bräunungsreaktionen, zur Geschmackserhaltung, teilweise zur Unterbrechung von Gärungsvorgängen und in kleinen Mengen zur Stabilisierung von Anthocyanen eingesetzt. Da nach RANKINE nur die freie Form wirksam ist, sollte ihr Anteil möglichst hoch sein (83). Speziell für Wein hat PAUL (79) die Anwendungsgebiete in drei große Gruppen geteilt:

- die biologische Wirkung
- die enzym-inaktivierende Wirkung
- die geschmacksbeeinflussende Wirkung

Die biologische Wirkung sieht man vor allem im Zusammenhang mit Mikroorganismen. In Maische und Most wird bei Verwendung von schwefliger Säure eine positive Auslese getroffen, die durch die Unterdrückung von schädlichen Bakterien und schwachen Hefen zu einer reintonigeren Gärung führen soll. Nach WALLHÖFER (110) beruht diese Wirkung der schwefligen Säure auf der spezifischen Hemmung der Dehydrogenasen, vor allem der Enzyme die SH-Gruppen tragen. Dabei werden Bakterien in stärkerem Maße geschädigt als manche Hefen.

Die enzym-inaktivierende Wirkung ist vor allem im Hinblick auf die Oxydationsenzyme wichtig. Die schweflige Säure blockiert Kupfer, die Schwermetallkomponente des Enzymkomplexes, was

für das Enzym selbst eine derartige Schädigung bedeutet, daß es dadurch funktionsunfähig wird. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Ergebnisse von JOHNSON (46), der die Wirkung auf die Polyphenoloxydase untersuchte. Der Autor fand, daß nicht die Polyphenoloxydase gehemmt wird, sondern vielmehr die Sauerstoffübertragung durch das Enzym bevorzugt auf die schweflige Säure durchgeführt wird und dadurch die Oxydation anderer Mostinhaltsstoffe verhindert wird. Nach erfolgter Sauerstoffübertragung wird das Ferment unwirksam.

Die geschmacksbeeinflussende Wirkung kommt wohl hauptsächlich durch die Abbindung des im Wein vorhandenen Acetaldehyds zustande. Andererseits spielt auch die Erfahrung eine Rolle, derzufolge die Weine der nördlichen Weinbauregionen unter "reduktiven" Verhältnissen ihre beste und schönste Entwicklung erlangen.

1.2. Bedenklichkeit der SO_2

In einer Arbeit von HÖTZEL (34) wird darauf hingewiesen, daß der Abstand zwischen der durchschnittlich aufgenommenen Menge an SO_2 und der Dosis, die mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ungefährlich ist, nämlich etwa 10 mg SO_2 /Tag für den 75 kg schweren Mann bedenklich gering erscheint. Die mittlere Tagesaufnahme der westdeutschen Bevölkerung liegt bei 20 mg SO_2 pro Kopf der Bevölkerung und wurde nach statistischen Angaben über den Konsum von Rosinen, Trockenobst, Traubensaft und Wein (97) errechnet. Die SO_2 -Aufnahme aus Trockengemüse und Kartoffelerzeugnissen, die teilweise sehr hohe Restmengen an SO_2 enthalten (32), ist in diesem Wert ebensowenig einbezogen wie die aus Obstpülp, Obstmark und Zitronenmutterssäften.

Nach LANG (55) ist SO_2 ein regelmäßiges Intermediärprodukt des Stoffwechsels. Sie kommt aber infolge der Aktivität der Sulfitoxydase, außer in Bullensperma, nicht in meßbaren Mengen in freier Form vor. Die LD_{50} von Sulfiten bei intravenöser Injektion wurde bei der Maus mit 130 mg/kg NaHSO_3 und 155 mg/kg Na_2SO_3 bestimmt. Viele Autoren haben die Toxizität der SO_2 im Tier-

versuch untersucht. FITZHUGH und Mitarbeiter (27) nennen 14 mg SO_2 pro kg Ratte/Tag unbedenklich, nach CHERNOKAN (12) rufen 50-100 mg SO_2 /l Traubensaft bei Ratten und Mäusen Leberdystrophie und andere morphologische sowie biochemische Veränderungen hervor. HÖTZEL (35) hält aufgrund seiner Tierversuche eine drastische Beschränkung der Wein- SO_2 für unumgänglich. CREMER und HÖTZEL (15) stellten fest, daß in vivo ein Thiamin-Sulfit-Antagonismus besteht. Bei vollernährten Ratten wurde die Gewichtsentwicklung durch Dosen bis zu 400 mg/kg/Tag - im Verlauf von über drei Monaten - nicht beeinflusst. Thiaminmangeltiere dagegen antworteten schon auf kleine Dosen von SO_2 (50 mg SO_2) mit Wachstumsdepression und Rückgang der Überlebensrate. Nach WILMES (112) verbessert eine bedarfsüberschreitende Thiaminzufuhr die Verträglichkeit für SO_2 .

HÖTZEL fand weiterhin (35), daß Natriumdisulfit und Glucose-Nahydrogensulfit in gleicher Weise wirkten, während die Toxizität von Acetaldehyd-Natriumhydrogensulfit vielleicht geringfügig kleiner war. Aufgrund der verschiedenen Dissoziationskonstanten der eingesetzten Additionsverbindungen hätte man ein anderes Ergebnis erwartet; denn Acetaldehyd-Hydrogensulfit ist mit einer Dissoziationskonstante von $2,54 \cdot 10^{-6}$ bei pH 3,2 sehr stabil. Nach TANNER (103) gibt die Additionsverbindung der Glucose 150 000 mal leichter HSO_3^- -Ionen ab, als unter gleichen Bedingungen HSO_3^- -Ionen von der Acetaldehyddisulfitanlagerung frei werden. Die Acetaldehyd-Hydrogensulfit-Verbindung müßte durch diese Eigenschaft weniger toxisch sein als die Additionsverbindung mit Glucose; die Versuche zeigten aber, daß das nicht der Fall ist. Die schnelle Freisetzung von SO_2 im Magensaft wird von SCHANDLER (93) bestätigt. Nach LANG (55) erfolgt die Spaltung bei anaziden und hypaziden Magensaftverhältnissen besonders rasch. Trotzdem sind nach Angaben dieses Autors die Untersuchungen über subchronische Toxizität widerspruchsvoll; denn manche Menschen scheinen 2 g SO_2 /Tag symptomlos zu vertragen, während andere bereits auf 50, 25 ja 10 mg/Tag mit

Kopfschmerzen, Völlegefühl und anderen subjektiven Beschwerden reagieren. Unter Berücksichtigung dieser Befunde wird ein Maximum von 200 mg/l Gesamtschweflige-Säure und 50 mg/l freier schwefliger Säure gefordert. Dieser Forderung schließt sich LEUCH (57) an, der schon 1895 Versuche zur "Schädlingsgrenze der SO_2 bei Menschen" durchgeführt hatte. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch CREMER und Mitarb. (16) nachdem sie die in vitro und am Tier gefundenen Ergebnisse am Menschen überprüft hatten. Nachdem eine Thiaminunterversorgung erreicht worden war, wurden während 25 Tagen 400 mg SO_2 pro Versuchsperson gereicht. Die Ergebnisse zeigen, daß weder der Thiaminstoffwechsel signifikant beeinflußt wurde, noch die Sulfitoxydation gestört. Bei einem Sicherheitsfaktor von 10 : 1 kann man die SO_2 -Menge von 40 mg/Person und Tag unbedenklich nennen. Die Ergebnisse deuten auch auf die Schwierigkeiten bei der Ableitung duldbarer Fremdstoffaufnahmen für den Menschen aus den Ergebnissen von Tierversuchen hin. Trotzdem wird man gerade in Bezug auf Wein, der im Liter normalerweise bis zu 300 mg SO_2 enthält, bestrebt sein diese SO_2 -Menge, sei es in gebundener oder freier Form, so niedrig wie möglich zu halten. Dies ist aber nur dann möglich, wenn gleichzeitig der Acetaldehydgehalt der Weine niedrig gehalten und so das SO_2 -Bedürfnis reduziert wird.

1.3. SO_2 und Acetaldehyd

Bei den Ausführungen zur geschmacksbeeinflussenden Wirkung der SO_2 war schon erwähnt worden, daß eine Aufgabe der schwefligen Säure darin besteht, den Acetaldehyd abzubinden. PAUL (79) meint dazu: " Welche Bedeutung der Fähigkeit, den Acetaldehyd zu binden zukommt, möge man daraus ermessen, daß dies der entscheidende Grund dafür war, daß die schweflige Säure nicht ersetzt werden konnte. Denn letzten Endes hätte man die biologische wie die enzyminaktivierende Wirkung unter Anwendung der Hochkurz-Erhitzung bewerkstelligen und die schweflige Säure als

Reduktionsmittel vielleicht doch ersetzen können. Gänzlich unersetzlich aber ist die schweflige Säure als jene Substanz, die den Acetaldehyd zu binden und geschmacklich auszuschalten imstande ist. "

Dem Acetaldehyd als integrierendem Bestandteil eines Weines kommt demnach eine wesentliche, wenn auch für unsere Weine negative Bedeutung zu. Von KIELHÖFER (49) wurde nachgewiesen, daß sich freier Acetaldehyd mit dem heute gültigen Geschmacksbild des Weißweines nicht vereinbaren läßt und zwar aus dem Grunde, weil heute auf die sortenbedingten Aromasubstanzen, welche dem Wein seine so sehr geschätzte Eleganz verleihen, größter Wert zu legen ist. Etwas ähnliches meint SALLER (91) wenn er sagt, daß der SO_2 -Zusatz zur Hebung des Buketts beiträgt.

Im Gegensatz zu den Normalweinen kommt dem Acetaldehyd im spanischen Jerez und nach PAUL (79) im österreichischen Schaumwein eine positive Rolle zu.

Aber es wurde nicht allein festgestellt, daß Acetaldehyd ein sehr geschmackswirksamer Faktor ist, sondern auch, daß die gebundene schweflige Säure im Wein überwiegend aus an Acetaldehyd gebundener SO_2 besteht. (48, 114, 115, 103, 6). Andererseits macht die gebundene SO_2 den Hauptteil der gesamten SO_2 des Weines aus. Der Acetaldehyd ist demnach in jedem Falle die Ursache für das mehr oder weniger hohe SO_2 -Bedürfnis eines Weines.

Acetaldehyd entsteht durch irreversible Decarboxylierung von Pyruvat mittels Pyruvatdecarboxylase als Zwischenprodukt im Verlauf der anaeroben Vergärung von Glucose. Nach SCRIBA (96) wird dieser Acetaldehyd nicht sofort quantitativ zu Äthanol hydriert, sondern entzieht sich zum Teil dem Umsatz mittels ADH durch Diffusion ins Medium. Die Konzentration an Acetaldehyd weist in der logarithmischen Wachstumsphase die höchsten Werte auf und sinkt am Ende der Gärung wieder ab (105). In diesem Stadium bewegt sich der Gehalt an Acetaldehyd im Wein nach Angaben verschiedener Autoren (85, 48, 69, 87, 70, 102)

zwischen 0 und 303 mg/l, der Acetaldehydgehalt in einem anderen Gärungsprodukt dem Bier nur zwischen 2,3 und 22 mg/l (62, 3). Nach der Häufigkeit geordnet stellten PATSCHKY und SCHÖNE (75) fest, daß der größte Prozentsatz der Weine einen Acetaldehydgehalt zwischen 21 und 40 mg/l enthält. Zwischen Weiß- und Rotwein gibt es keine signifikanten Unterschiede. Die Rotweine tendieren jedoch zu niedrigeren Werten. In Bezug auf Acetaldehyd getrennt zu behandeln sind besondere Weine wie Auslesen, Beerenauslesen und Trockenbeerenauslesen. Dem wurde aber im Weingesetz Rechnung getragen; denn für diese Spezialitäten sind höhere SO_2 -Gehalte zugelassen (108). Für die übrigen Weine gilt die Höchstgrenze von 300 mg gesamt SO_2 und im Gesetz über Wein, Dessertwein, Schaumwein u.s.w. vom 16. Juli 1969 heißt es dazu: "Durch Rechtsverordnung können die Höchstwerte herabgesetzt werden, wenn es nach den Erkenntnissen der Wissenschaft technisch vertretbar ist; ferner kann ein höherer Gehalt zugelassen werden, wenn dies technisch erforderlich und mit dem Schutz der Gesundheit vereinbar ist". (29).

Vom gesundheitlichen Standpunkt ist man aber, wie gezeigt wurde, eher bestrebt die SO_2 in Lebensmitteln, besonders im Wein, der oft in größeren Mengen genossen wird, so niedrig wie möglich zu halten.

1.4. SO_2 -Gehalt verschiedener Weine

Möglichkeiten zur Beschränkung der SO_2 -Menge ergeben sich beim Weinausbau und der Weinbehandlung. Aber auch mit der besten Kellertechnik gelingt es z. Zt. nicht, ein durch den Acetaldehyd bedingtes, den natürlichen Gegebenheiten des Substrats entsprechendes SO_2 -Bedürfnis auszuschalten. Denn allein dadurch, daß das Ausgangssubstrat in seiner Zusammensetzung und die Hefen in Bezug auf ihre spezifische Enzymaktivität große Differenzen zeigen, kann es dazu kommen, daß Weine in Südafrika einen Gesamt- SO_2 -Bedarf von im Durchschnitt 70 mg/l haben, und Biere im

allgemeinen einen Acetaldehydgehalt von weniger als 20 mg/l haben, während in nördlichen Weinbaugebieten ein durchschnittlicher Gesamt-SO₂-Bedarf von 200 - 250 mg/l als normal angesehen wird. Dabei handelt es sich, wie die Statistik immer wieder zeigt, größtenteils um an Acetaldehyd gebundene SO₂. Die an Pyruvat gebundene SO₂ spielt eine etwas geringere Rolle. Pyruvat wird einerseits nicht so stark gebunden wie Acetaldehyd und kommt in der Regel auch nicht in Mengen vor, wie man sie von Acetaldehyd gewöhnt ist (114). Die Substrat bedingten Differenzen werden von DITTRICH (24) aufgrund seiner Ergebnisse mit Mosten verschiedener Traubensorten bestätigt.

Es war Aufgabe und Ziel der vorliegenden Arbeit zunächst zu klären, ob und inwiefern Mostinhaltsstoffe für die Differenzen im Acetaldehydgehalt und im Pyruvatgehalt der Weine ursächlich sind und damit gleichzeitig einen Weg zur Senkung des SO₂-Bedürfnisses zu finden. In einem zweiten Teil wurde der Versuch unternommen, den nach der Gärung verbleibenden Acetaldehyd enzymatisch abzubauen.

2. Literaturangaben über die Bildung von Acetaldehyd während der Gärung

2.1. Acetaldehydbildung im Verlauf der Gärung

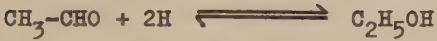
2.1.1. Entstehung des Acetaldehyds

Acetaldehyd (CH₃-CHO) ist ein Intermediärprodukt der alkoholischen Gärung. Er wird durch Decarboxylierung der Brenztraubensäure gebildet und im weiteren Verlauf zu Äthylalkohol reduziert oder zu Säuren oxydiert.

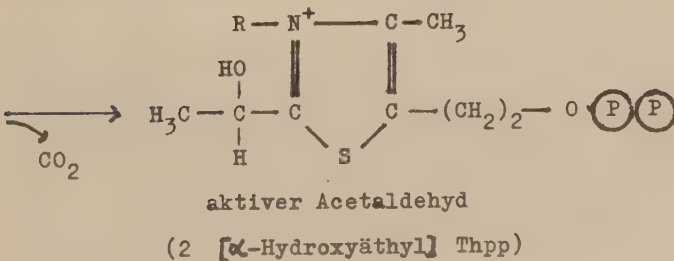
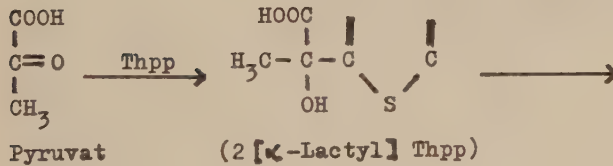
Gl. 1



Gl. 2



Andererseits kann Acetaldehyd auch aus Alkohol oder Essigsäure aufgebaut werden (48). Die Bildung aus Brenztraubensäure wird im folgenden Formelbild wiedergegeben:



An Brenstraubensäure wird Thiaminpyrophosphat angelagert, dabei wird Pyruvat aktiviert und anschließend mittels Pyruvat-decarboxylase zum aktivierten Acetaldehyd decarboxyliert (37, 38, 11, 47). Bei den anaeroben Pyruvatdecarboxylasen wird der Aktivacetaldehyd in freien Acetaldehyd umgewandelt, während bei den Pyruvatoxydasen unter Beteiligung von Liponsäure, CO A-SH und NAD Acetyl-CO A entsteht (39). Wie wir später im Zusammenhang mit der NAD -Bilanz sehen werden, erklärt sich allein dadurch der Stau an freiem Acetaldehyd, der zu Beginn der Gärung auftritt und allmählich abgebaut wird. Das Ausmaß des Staus ist, wie FÖRNACHON festgestellt hat (28), von der relativen Geschwindigkeit der aldehydbildenden und verbrauchenden Reaktionen abhängig. Diese Reaktionen sind aber andererseits nur Teil einer ganzen Reaktionskette, nämlich der Glykolyse.

2.1.1.1. Glykolyse

Eigentlich versteht man unter Glykolyse den anaeroben Abbau der Kohlenhydrate. Es hat sich jedoch gezeigt, daß auch der aerobe Stoffwechsel über zahlreiche Stufen der Glykolyse verläuft und sich nur durch die Verwendung der reduzierten Coenzyme und der Brenstraubensäure unterscheidet (47).

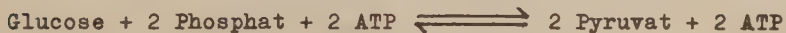
Zur Durchführung der Glykolyse bis zum Pyruvat sind nach LEHNINGER (56) 10 verschiedene spezifische Enzyme erforderlich, die so hintereinander geschaltet sind, daß das Reaktionsprodukt der ersten Enzymkatalyse das Substrat der nächsten Reaktion ist. Vor allem die Reaktionen sind wichtig, die direkt für die Energiebilanz und die NAD -Bilanz entscheidend sind. Das Angebot an Ammonium-Ionen z. B. löst ATP verbrauchende Syntheseprozesse aus (Säureamidbildung, Aminierungen und damit Proteinsynthesen, Purin- und Pyrimidin-Hämiansynthese). Dadurch steht für die Triosephosphatdehydrierung im Sinne der Theorie von LYNNEN (61)

mehr anorganisches Phosphat und ADP zur Verfügung, der Kohlenhydratdurchsatz wird gesteigert. Sekundär ist damit eine vermehrte NADH-Anlieferung verbunden, die zu vermehrter Atmungskettenphosphorylierung führt. Diese Quelle liefert wieder neues ATP und schließt damit den Kreis.

2.1.1.2. ATP-Bilanz

Ein ATP-Molekül wird bei der durch das Enzym Hexokinase katalysierten Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat verbraucht. Das zweite Molekül ATP ist an der Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-diphosphat beteiligt. Die Reaktion wird durch das Enzym Phosphofructokinase katalysiert. Die Bedeutung der Glykolyse besteht aber in der ATP-Produktion. Der Einsatz der 2 verbrauchten ATP-Moleküle ist gewissermaßen eine Starthilfe. Bei dem Schritt von der 1,3 Diphosphoglycerinsäure zur 3 Phosphoglycerinsäure werden 2 ATP frei und 2 weitere bei der Bildung von Pyruvat aus Phosphoenolbrenztraubensäure. Energiemäßig ergibt sich daraus folgende Gleichung:

Gleichung 3:



Bis auf das Ausgangssubstrat Glucose und das Endprodukt Brenztraubensäure sind alle Zwischenprodukte der Glykolyse Phosphorsäureester. Glucose und in gewissem Maße Brenztraubensäure können die Zellmembran ungehindert durchdringen. Im Gegensatz dazu können die phosphorylierten Zwischenprodukte die Zellmembran nicht durchdringen. Könnten diese Zwischenprodukte die Zelle verlassen, so würde die Glykolyse natürlich nur mit einer verschwindend geringen Geschwindigkeit ablaufen. Der Mechanismus des glykolytischen Glucoseabbaus und die Reaktionsfolge der glykolytischen Enzymkette werden in Abbildung 1 dargestellt.

Abbildung 1

Reaktionsfolge der glykolytischen Enzymkette

ABB. 1

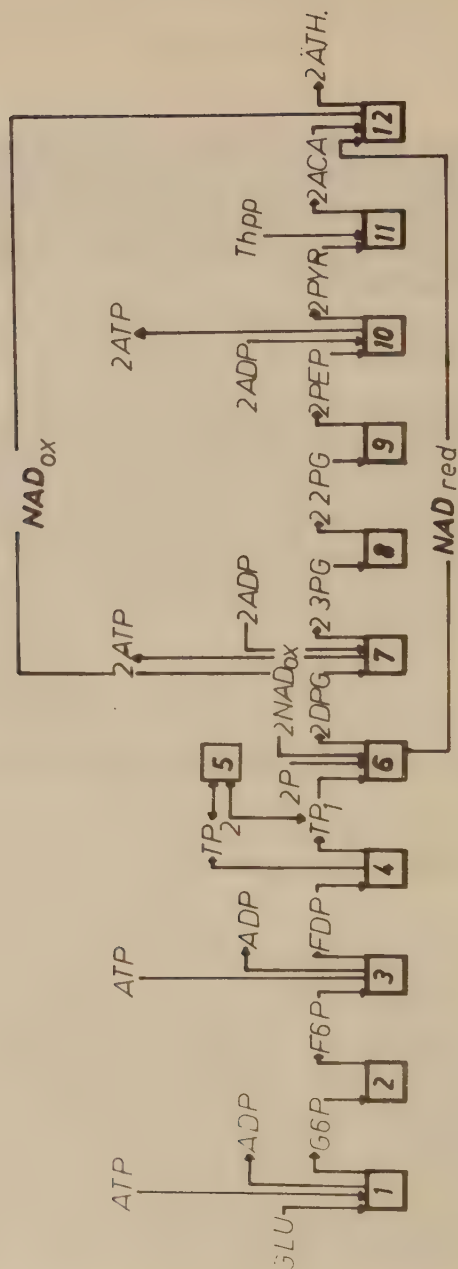


Abbildung 1 Die Reaktionsfolge der glykolytischen Enzymkette

(Schema nach Lehninger (56) um die Reaktionen vom Pyruvat zum Äthanol erweitert)

Namen der Enzyme und Zwischenprodukte:
(Erläuterung zu Abbildung 1)

Enzyme:

1. Hexokinase
2. Phosphoglucomutase
3. Phosphofruktokinase
4. Aldolase
5. Phosphotrioseisomerase
6. Phosphotriosedehydrogenase
7. Phosphoglyceratkinase
8. Phosphoglyceromutase
9. Enolase
10. Pyruvatphosphokinase
11. Pyruvatdecarboxylase
12. Alkoholdehydrogenase

Zwischenprodukte:

G6P Glucose-6-phosphat
F6P Fructose-6-phosphat
TP₁ 3-Phosphoglycerinaldehyd
TP₂ Dihydroxyacetonphosphat
P anorganisches Phosphat
NAD Nicotinamidadenin-dinucleotid
DPG 1,3 - Diphosphoglycerinsäure
3PG 3-Phosphoglycerinsäure
2PG 2-Phosphoglycerinsäure
PEP Phosphoenolbrenztraubensäure
PYR Pyruvat
ACA Acetaldehyd
Äth. Äthanol

2.1.1.3. NAD - Bilanz:

Außer ATP kommt in der Zelle eine zweite äußerst wichtige Substanz vor, das Coenzym bzw. Cosubstrat NAD. Seine Funktion ist elektronenübertragender Art; NAD ist ein universeller Elektronenüberträger. Die enzymatische Oxydation von 3-Phosphoglycerinaldehyd durch NAD ist mit der Aufnahme von Phosphorsäure gekoppelt; als Reaktionsprodukt entsteht die energiereiche 1,3 Diphosphoglycerinsäure. Es kann hier gezeigt werden, in welcher Weise bei einer enzymatischen Oxydation chemische Energie in Form von ATP gewonnen und konserviert wird.

In Gleichung 4 und 5 werden diese Schritte in Form von Formeln dargelegt.

Gleichung 4:



Gleichung 5:



Der Oxydationsprozeß ist mit der Bildung eines energiereichen Derivats des Oxydationsproduktes verbunden, das anschließend seine Phosphatgruppe auf ADP übertragen kann. Der aerobe Organismus oxydiert die entstandene Brenztraubensäure, die hier nicht aus der Zelle ausgeschieden wird, zu CO_2 und H_2O . Der anaerobe Organismus bildet entweder wie z. B. die Lactobazillen Milchsäure oder wie viele Hefen über einige Zwischenschritte Äthanol.

2.1.2. Gärungsphasen

Vergärung eines Substrates mittels Hefe:

Die Hefe gehört zu den Organismen, die wir als fakultativ aerob

bzw. anaerob bezeichnen. Es ist eine wesentliche Eigenschaft dieser Zellen, daß sie einerseits in einer sauerstofffreien Umgebung in der gleichen Weise wie strikte Anaerobier durch anaerobe Gärung Energie aus Glucose gewinnen können, andererseits aber in Gegenwart von Sauerstoff den sauerstoffabhängigen oxydativen Abbau von Nährstoffen bevorzugen. Speziell werden wir uns im Verlauf dieser Arbeit mit Hefen beschäftigen, die unter anaeroben Bedingungen Glucose zu Äthanol abbauen. Bei der normalen Vergärung von Maischen oder Säften haben wir es zunächst mit einer aeroben Phase zu tun. Dieser schließt sich dann, wenn der anfängliche Sauerstoff verbraucht ist, eine anaerobe Phase an. Beiden Phasen gemeinsam ist, wie bereits erwähnt wurde, der Weg bis zum Pyruvat.

2.1.2.1. Aerobe Phase

Atmungskette:

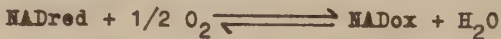
In der aeroben Phase wird NADred nicht mittels Acetaldehyd reduziert, sondern über die Atmungskette. Nach LEHNINGER (56) kommen die an der Atmung beteiligten Enzyme nicht frei gelöst im Cytoplasma der Zelle vor, sondern in den Mitochondrien, den Kraftstationen der Zelle gebunden und in spezifischer Weise räumlich angeordnet. Es führte zu weit, wollte man verfolgen, wie die Brenztraubensäure, ein Endprodukt der Glykolyse, durch die Reaktionen des Citronensäurezyklus abgebaut wird. Es sei nur gesagt, daß der Weg wie bei der Entstehung von Acetaldehyd über aktives Pyruvat geht, das dann aber auf Liponsäure übertragen wird und mit Coenzym A zu Acetylcoenzym A oxydiert wird. In Gleichung 6 wird der Vorgang dargestellt.

Gleichung 6:



Die Gleichung zeigt, daß NADred entsteht, das genauso wie das bei der Oxydation von 3-Phosphoglycerinaldehyd entstandene auf die

Atmungskette übertragen wird. In der aeroben Zelle ist der molekulare Sauerstoff der letzte Elektronenakzeptor. Die Kette selbst besteht aus einer Anzahl hintereinander geschalteter Cytochrome. Summarisch kann man die Vorgänge der Atmungskette folgendermaßen zusammenfassen:



Wollte man allein die Vorgänge in den Mitochondrien betrachten, wollte man die Hefe in der ersten Phase der Gärung als strikten Aerobier betrachten, dann könnte man es bei den gemachten Aussagen bewenden lassen. Da aber auch die Enzyme im Cytoplasma in dieser Phase aktionsfähig sind, da die Hefe auch jetzt das ganze Spektrum an Enzymen der anaeroben Phase beinhaltet und aktiviert hat, muß man sich schon unter aeroben Verhältnissen mit den Vorgängen der Anaerobiose beschäftigen.

Die Glykolyse läuft in beiden Phasen bis zum aktivierten Acetaldehyd gleich ab. Bei Sauerstoffzufuhr sind Pyruvatoxydasen vermehrt tätig und es entsteht in großen Mengen Acetyl-CO_A, in vermindertem Ausmaß sind aber auch die Pyruvatdecarboxylasen tätig, die Aktivdehyd in freien Acetaldehyd umwandeln. Da aber der oxydative Mechanismus beim Diaphorase-cytochrom-O₂ System sehr aktiv ist, steht zur Reduktion des Acetaldehyds kein NADred zur Verfügung, und es kommt zum Acetaldehydstau. Diese Aussage wird von FORNACHON (28) bestätigt. Er hat festgestellt, daß die Aldehydanhäufung bei niedriger Sauerstoffspannung stark gehemmt ist und unter anaeroben Bedingungen gar keine Anhäufung des Aldehyds nachgewiesen werden konnte. TRILLAT (106) stellte sogar eine Acetaldehydanhäufung fest, als er eine Hefesuspension in einer wässrigen Alkohollösung unter Luftzufuhr schüttelte. Zum Verhalten der ATP in dieser Phase macht HOLZER (43) einige interessante Aussagen.

Die im Cytoplasma lokalisierte Hexokinase phosphoryliert aerob langsamer Glucose als anaerob. 1861 hatte PASTEUR (74) festgestellt, daß Hefezellen unter sonst gleichen Bedingungen aerob

langsamer Glucose umsetzen als anaerob. Dieses Phänomen wird als "Pasteur-Effekt" bezeichnet. Der Effekt beruht auf einer Kumulation der ATP am Ort ihrer Erzeugung nämlich den Mitochondrien, während das Cytoplasma an ATP verarmt. Sowohl der Weg des NAD als auch der Standort der ATP deuten auf eine vermehrte Tätigkeit in den Mitochondrien hin, die in Konkurrenz zum Acetaldehydabbau steht.

Vermehrung:

Eine Steigerung der aeroben Gärung bei Hefezellen ist mit einer stationären Konzentration an Brenztraubensäure verknüpft. Da Brenztraubensäure eine Zentrale der Synthese verschiedenster Zellinhaltsstoffe repräsentiert, dürfte hier ein Bindeglied der enzymatischen Koppelung zwischen aerober Gärung und Wachstum sein (42). Nach SCHMID (95) ist das Zellwachstum und die Zellvermehrung der Hefe an die aerobe Phase gebunden. In den ersten 3 - 4 Std. erfolgt eine deutliche Substanzzunahme, der nach 6 - 8 Std. eine Zellvermehrung folgt. Nach HOLZER (41) setzt sogar schon nach einer halben bis einer Std. Zellvermehrung ein, wenn man nicht wachsende, Glucose oxydierende Zellen mit den für das Wachstum nötigen Nährstoffen versetzt. Unter anaeroben Bedingungen wird eine solche Veränderung nicht festgestellt; d. h., daß Sauerstoff die Bedingung für Wachstum ist.

Primär ist mit Wachstum die Stickstoff-Assimilation verbunden. Die aerobe Glykolyse ist nicht unbedingt Voraussetzung für eine optimale Vermehrung. Die Bedeutung der Glykolyse für die Vermehrung liegt in erster Linie in der Bildung von Ribose als Intermediärprodukt zu der Synthese von Nucleotiden. Wichtige Beiträge des Kohlenhydratabbaus für die Zellvermehrung sind demnach:

- a) Die an die Atmung gebundene Bildung von Aminosäuren bzw. Eiweiß und von Vorprodukten zur Synthese der Nucleotidbasen.
- b) Die Lieferung von Ribose-5-phosphat entweder auf dem Weg der oxydativen Decarboxylierung oder glykolytisch über die Transketolase-Transaldolase-Reaktion.

GOTTSCHALK (30) bestätigt die Funktion der Glykolyse für den Zellaufbau. Nach seinen Messungen werden 77,4 % der von Hefe verbrauchten Glucose zu CO_2 und Alkohol vergoren; bei einem Verhältnis von 1 : 1,03. 22,6 % der verbrauchten Glucose werden für andere Prozesse verbraucht und 65,7 % der verbrauchten, aber nicht vergorenen Glucose wird in Form von Hefesubstanz (Zellmaterial) wiedergefunden.

Die beschriebenen Prozesse, die sich in Wachstum und Vermehrung äußern, sind außer der Atmungskette sehr stark am Verbrauch von NAD^{red} beteiligt. Bei NH_4^+ -Zusatz z. B. sinkt die α -KGS-Konzentration ab. Verantwortlich dafür ist das Glutaminsäuredehydrase-System dessen Gleichgewicht weitgehend auf der Seite der Glutaminsäure liegt.

Gleichung 7:



2.1.2.2. Übergangsphase

Übergang von aerober zu anaerober Phase:

Mit dem allmählichen Verbrauch des Sauerstoffs im Gärmedium wird die Atmung langsam gestoppt, die Vermehrung wird eingestellt und in der Zelle staut sich aufgrund des O_2 -Mangels NADH an. (Auch die NADH verbrauchenden Aminierungsprozesse hören bei Sauerstoffmangel auf). Da schon Acetaldehyd vorhanden ist, kann die Zelle jetzt NAD^{ox} gewinnen, indem sie den Acetaldehyd katalysiert und mit ADH zu Äthanol reduziert. Der freie Acetaldehyd aus dem Substrat penetriert in die Zelle, und langsam stellt sich ein Gleichgewicht ein (31). Der Quotient NADH frei : NAD frei vergrößert sich. Während aerob durch die Atmungskette eine NADH oxydierende Reaktion in Funktion trat, ist anaerob der Quotient nur vom Zusammenwirken des oxydierenden und reduzierenden Gärungs-enzymes Triosephosphatdehydrase und Alkoholdehydrase abhängig.

In Konkurrenz zur phytochemischen Reduktion des Acetaldehyds steht die Bildung des Glycerins; ebenfalls eine NADH verbrauchende Reaktion. Diese Verhältnisse sind in dem folgenden Schema, Abb. 2, graphisch dargestellt.

Abbildung 2

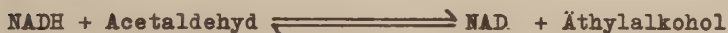
Der Weg von reduziertem NAD in den verschiedenen Gärungsphasen

2.1.2.3. Anaerobe Phase

Abhängigkeit vom Massenwirkungsgesetz - Acetaldehydabbau:

Wenn man jetzt um den Kreis zu schließen, allein die chemische Reaktion betrachtet, durch die der Äthylalkohol bei der alkoholischen Gärung entsteht, und durch die der Acetaldehyd abgebaut wird, dann hat man eine Reaktion, die genauso wie alle anderen vom Massenwirkungsgesetz abhängig ist:

Gleichung 8:



Die Reaktion wird durch ein dissozzierendes Proteid bewirkt dessen prosthetische Gruppe NAD ist. Nach NEGELEIN (66) ist der Gleichgewichtszustand der Reaktion erreicht, wenn bei 20° C und pH 7,9 die Konzentration des Alkohols das 1350 fache der Konzentration an Acetaldehyd beträgt. Die Gleichgewichtskonstante K für die Reaktion ist 1,35 mal 10³. Im Gleichgewichtszustand liegt die Hälfte des NADs hydriert vor.

$$K = \frac{\text{NAD mal Alkohol}}{\text{NADH mal Acetaldehyd}}$$

Jede Vergrößerung des Verhältnisses Acetaldehyd : Alkohol entspricht einer Verkleinerung des Verhältnisses DPNH₂ : DPN und umgekehrt.

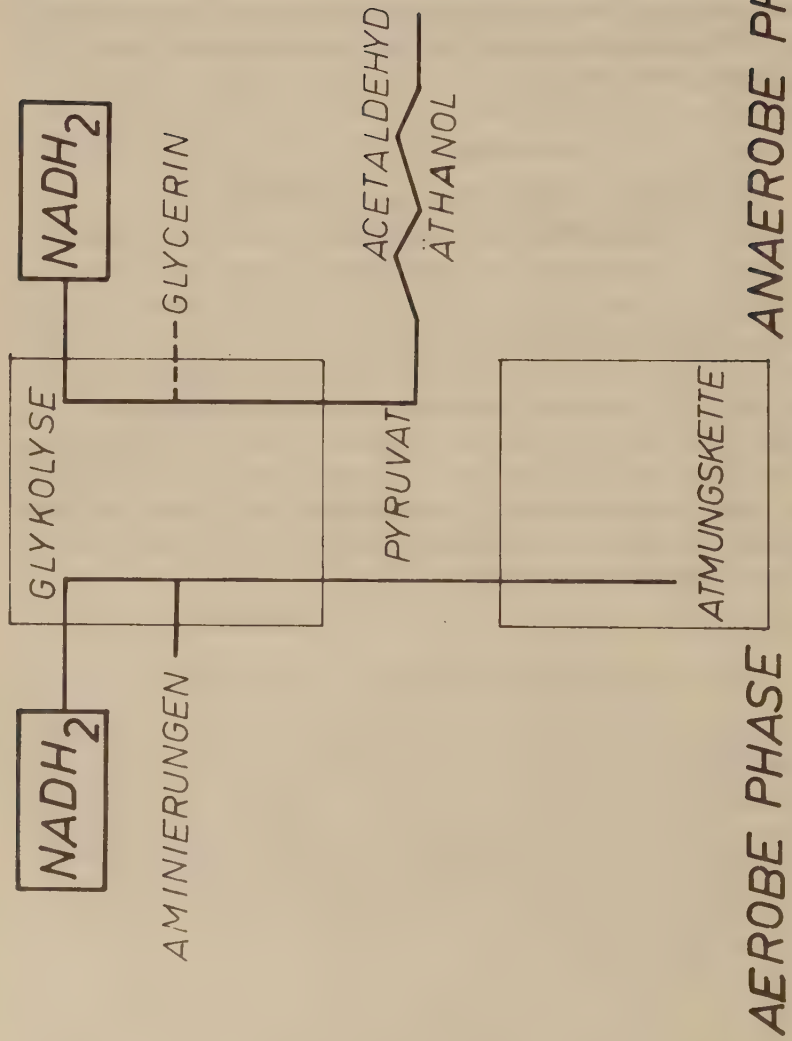


Abbildung 2 Der Weg von reduziertem NAD in den verschiedenen Gärungsphasen

Wenn im Wein eine mittlere Alkoholkonzentration von 10 % Vol. angenommen wird, dann müßte unter beschriebenen Bedingungen die Acetaldehydkonzentration 62 mg/l betragen. Die an Acetaldehyd gebundene schweflige Säure beliefe sich demzufolge auf 89,9 mg/l. Der in der Praxis gemessene und auch in eigenen Gärversuchen ermittelte Acetaldehydgehalt ist aber oft niedriger. Eine Erklärung könnte in der von den Versuchsbedingungen verschiedenen Ionenkonzentration liegen, eine andere im veränderten pH, der nach CONWAY (13) für das Zellinnere bei pH 6 liegt. Bei gärenden und atmenden Zellen schwankt das pH außerdem um 0,3 Einheiten. Nach HOLZER (40) sind Alkohol und Acetaldehyd bei pH 6 gleichmäßig über die gärende Hefezelle und das Medium verteilt. Damit wäre das Verhältnis von Acetaldehyd zu Äthanol sowohl in der Zelle als auch im Medium gleich, und der verschiedene Acetaldehydgehalt läßt sich nicht durch Differenzen dieser Art erklären. Da die Umsatzkapazität der ADH in Hefe wesentlich größer als der Kohlenhydratdurchsatz bei der Gärung ist, sind auch Erklärungsmöglichkeiten von der ADH her ausgeschlossen (42). An dem Enzym ADH stellt sich immer das Gleichgewicht ein. In Modellgärversuchen bleibt sowohl bei aeroben als auch bei anaeroben Verhältnissen das Verhältnis von Alkohol zu Acetaldehyd gleich. Wie wir sehen werden, trifft das für die gebräuchliche Mostvergärung nicht zu. Der Grund ist in verschiedenen NADH-Wegen, in ATP-Kumulationen und in sich ändernden Enzymaktivitäten zu suchen. Auch kann sich im Verlauf der Gärung kein Gleichgewicht einstellen, da NADH und die Metaboliten, die als Substrate dienen, ständig nachgeliefert werden.

2.2. Acetaldehyd in Abhängigkeit von Substrat und Gärbedingungen.

2.2.1. Glucosekonzentration:

Es ist allgemein bekannt, daß Spätlesen und Auslesen ein höheres SO_2 -Bedürfnis haben als normale Weine. Im neuen Weingesetz ist das insofern berücksichtigt, als für Auslesen, Eisweine und Weine über 110 g/l Alkohol 60 mg freie und bis zu 350 mg/l gesamte SO_2

gestattet sind, während für Weine von Auslesen aufwärts, d. h. Beerenauslesen u.s.w. 400 mg/l gesamte SO_2 und 75 mg/l freie SO_2 erlaubt sind. Es erhebt sich nun die Frage, ob der SO_2 -Bedarf auf einen hohen Acetaldehydgehalt des Weines zurückzuführen ist, oder ob die SO_2 bei diesen Weinen vorwiegend als Rest- SO_2 gebunden ist. DITTRICH und STAUDENMAYER (21) vermuteten, daß der SO_2 -Bedarf bei Auslesen und Weinen mit noch höherem ursprünglichen Mostgewicht, auf einen hohen Acetaldehydgehalt, bedingt durch eine gehemmte Gärung zurückzuführen sei. DITTRICH und GONGSAKDI (22) verfolgten die Gärung bei entsprechenden Glucosekonzentrationen und fanden, daß die Gärungsintensität mit zunehmendem Zuckergehalt des Substrates immer geringer wird, da die ihr zugrundeliegende Zellvermehrung durch den hohen osmotischen Wert in steigendem Maße gehemmt wird. In Bezug auf den Acetaldehydgehalt stellten sie fest, daß der Most mit der geringsten Zuckerkonzentration am wenigsten Acetaldehyd bildet. Bei der höchsten Zuckerkonzentration war die Acetaldehydbildung am größten. Dieses Ergebnis läßt sich dadurch erklären, daß Glucose eine stark induzierende Wirkung auf die Pyruvatdecarboxylase hat, deren Aktivität im Wachstumsverlauf beträchtlich variiert (73).

2.2.2. Hefe

Man kann immer wieder feststellen, daß die verschiedenen Hefestämme ganz verschiedene Eigenschaften haben, sei es in Bezug auf H-Ionen Verträglichkeit (59) (der letale pH-Wert schwankt für die verschiedenen Hefen von 1,5 bis 3,4), sei es in Bezug auf Äthanol Resistenz. Darum besteht durchaus die Möglichkeit, daß sie sich in Bezug auf ihr Acetaldehydbildungsvermögen unterscheiden. Verschiedene Forscher haben sich in vielfältigster Weise mit diesen Fragen befaßt und es seien nur einige Ergebnisse gebracht. POMPEI (81) hat bei seiner Promotionsarbeit verschiedene Hefestämme unter anderem auf Acetaldehydbildung untersucht. Er fand für die verschiedenen Stämme aus verschiedenen Gegenden

Süd-Europas vollkommen verschiedene Acetaldehydgehalte, die von 2 - 330 mg/l reichten, obwohl das Gärsubstrat immer dasselbe war. Sa HONG CHO (90) fand, daß 22 Stämme wilder, untergäriger und obergäriger Hefen, die vorwiegend im Bier gefunden werden, Acetaldehydmengen von 0,6 - 16,3 mg/l gebildet hatten. Brauhefen bildeten bei 3,7 % Vol. Alkohol im Mittel 11 mg/l Acetaldehyd, während bei den wilden Hefen 6 Stämme durchschn. 3,3 % Vol. Alkohol erzeugten und der Acetaldehydgehalt im Mittel bei 15 mg/l lag. Bei den restlichen 8 Stämmen lag der Äthanolgehalt bei 0,6 % Vol. und der Acetaldehydgehalt bei 5,0mg/l im Mittel. Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß der Acetaldehydgehalt sowohl vom Äthanolgehalt abhängt, als auch von den Enzymaktivitäten der einzelnen Hefen. Der Acetaldehydgehalt scheint sich umgekehrt proportional zur Gärungsintensität zu verhalten. In gewisser Weise ist auch die anfallende Pyruvatmenge für den Acetaldehydgehalt entscheidend. Man kann eine niedrige Pyruvatmenge auf eine große Pyruvatdecarboxylase-Aktivität zurückführen. HOLZER (45) und LAFON-LAFOURCADE und Mitarb. (54) beobachteten, daß die sezernierte Pyruvatmenge mit dem Stamm stark variiert.

2.2.3. Temperatur

Jeder Kellerwirt ist heute bemüht, die Gärung der Moste gut kontrollierbar zu halten, um so mehr und mehr das Betriebsrisiko zu vermindern und außerdem reintönigere Weine zu bekommen. Die Mittel, die zu diesem Zweck eingesetzt werden, sind vielfältiger Art und erstrecken sich von der Schwefelung des Mostes über Separieren bis zur gekühlten Gärung. Gerade das letztere, nämlich der Temperaturfaktor ist im Hinblick auf die Acetaldehydbildung von Interesse. KIELHÖFER und WÜRDIG (52) haben dazu festgestellt, daß der Acetaldehydgehalt im Wein nach einer Vergärung bei 13° C etwas höher war als bei der Vergärung bei 20° C. OUGH und AMERINE (70) stellten fest, daß bei 21° C ein höherer Acetaldehydgehalt vorlag, als bei 10 und 33° C. POMPEI (81) fand in Abhängig-

keit vom Most ganz unterschiedliche Werte. Bei einem Most, der im Institut abgepresst wurde, fand er bei der höheren Gärtemperatur (35°C) durchweg niedrigere Acetaldehydwerte als bei der Gärtemperatur von $16 - 18^{\circ}\text{C}$. Bei einem Most, der aus einer Genossenschaftskellerei stammte, fand er bei 35°C höhere Acetaldehydgehalte als bei $16 - 18^{\circ}\text{C}$. Sa HONG CHO (90) stellte fest, daß bei obergärigen Hefen und aerober Gärung der Acetaldehydgehalt mit abnehmender Temperatur fiel. Bei untergärigen Brauhefen war der Acetaldehydgehalt bei 18°C am höchsten, während er bei 8°C und 28°C etwa gleich groß war. Unter anaeroben Gärbedingungen verhält sich fast jede Hefe anders. Nach BÄRWALD (3) steigt mit der Erhöhung der Gärtemperatur der Gehalt an Acetaldehyd, während BAVISOTTO (4) feststellte, daß er sich bei kalter Gärführung gelegentlich erhöhte. Als Ursache für den größeren Gehalt an Gärungsnebenprodukten bei höherer Gärtemperatur werden der stärkere Aminosäurebedarf (25) und die erhöhte Hefevermehrung (67) angesehen. Nach EMEIS (26) ist die kalte Gärtemperatur physiologisch ungünstig für die Hefe, deren optimale Enzymaktivität bei einer Temperatur zwischen 25 u. 30°C liegt. Das sind Faktoren, die den bei hoher und bei niedriger Gärtemperatur gesteigerten Acetaldehydgehalt erklären können.

Aber außer diesen Faktoren müssen noch andere eine Rolle spielen, denn sonst wäre es nicht möglich, daß bei Gärtemperaturen von 8°C , die wirklich sehr unphysiologisch sind, von bestimmten Hefen weniger Acetaldehyd gebildet wird, als bei den höheren Temperaturen. Die Ergebnisse zeigen ganz eindeutig, daß die Hefe, das Substrat sowie die übrigen Gärbedingungen für die Acetaldehydmenge bei einer bestimmten Temperatur entscheidend sind. Da diese Faktoren nicht standardisiert sind, kommt es zu Ergebnissen von so widersprüchlicher Natur.

2.2.4. Enzymaktivität

Es wurde schon herausgestellt, daß die verschiedenen Hefestämme unterschiedlich viel Acetaldehyd bilden. Nach THEN und RADLER

(105) bestehen sehr enge Beziehungen zwischen der Pyruvat-decarboxylaseaktivität und der Acetaldehydproduktion einer Hefe, die auf die Kontrollfunktion der Pyruvatdecarboxylase bei der Acetaldehydakkumulation hindeuten. Obwohl aerob mehr freier Acetaldehyd auftritt als anaerob stellten SUOMALAINEN und OURA (100) und SUOMALAINEN (101) fest, daß das Enzym anaerob aktiver ist als aerob. Das beweist erneut, daß die Verfügbarkeit von NADH eine große Rolle spielt. Für das Maximum der Acetaldehydkonzentration ist ausschließlich die Aktivität der Pyruvat-decarboxylase verantwortlich. Die PD erreicht ihre maximale Aktivität etwa zur selben Zeit wie das Maximum der Acetaldehydkonzentration auftritt (105). Außerdem steigt die Acetaldehydkonzentration im Medium um so höher, je später die maximale Konzentration erreicht wird. Jung inoculierte Zellen zeigen die höchste und schnellste Acetaldehydbildung, während alte Zellen erst spät ihr Maximum erreichen. Da die Pyruvatdecarboxylase immer substratgesättigt ist, kann vom Verlauf der Acetaldehydbildung auf die Aktivität der Pyruvatdecarboxylase geschlossen werden. OURA und SUOMALAINEN (73) bestätigen diese Befunde, indem sie angeben, daß Stämme mit einer hohen Pyruvatdecarboxylaseaktivität mehr Acetaldehyd bilden, als Stämme mit einer geringen Aktivität. Außer der Pyruvatdecarboxylase spielt die Alkoholdehydrogenase eine entscheidende Rolle als Kontrollenzym der Acetaldehydkonzentration. LUTSDORF und MEGNET (60) und MEGNET (64) fanden, daß der Acetaldehydgehalt der spezifischen Aktivität der ADH umgekehrt proportional ist. MÄNDL und Mitarb. (63) stellten dagegen fest, daß die PD und die ADH zu demselben Zeitpunkt ein Aktivitätsmaximum haben. Wenn dies der Fall wäre, dann dürfte es zu keiner Acetaldehydakkumulation kommen, vorausgesetzt, daß nur die Enzyme für die Acetaldehydakkumulation von Bedeutung sind. Tatsächlich bestätigt auch HOLZER (42), daß die Umsatzkapazität der ADH in Hefe zu jedem Zeitpunkt wesentlich größer als der Kohlenhydratdurchsatz bei der Gärung ist. An dem Enzym ADH stellt sich das Reaktionsgleichgewicht ein und sowohl Acetaldehydakkumulation als auch Abbau, sind vom Verhältnis $\text{NADH} : \text{NAD}$ abhängig.

2.2.5. Belüftung

Mit dem Abstich der Weine geht oft eine O_2 -Aufnahme einher. Diese Situation wurde von KIELHÖFER und WÜRDIG (52) näher untersucht, und sie konnten feststellen, daß im Wein schon bei begrenzter Luftzufuhr vermehrt Acetaldehyd gebildet wird, und zwar dann, wenn die Hefe nicht quantitativ vom Wein getrennt wurde. Sie führen die Acetaldehydbildung auf enzymatische Oxydation des Alkohols unter Mitwirkung der ruhenden Hefe infolge des Luftzutritts zurück. Unter streng anaeroben Gärungsverhältnissen konnten sie keinen Acetaldehydanstieg bemerken. PAUL (78) machte dazu bestimmte Beobachtungen bei Faßausschankweinen. Einige Tage nach Anbruch eines Fasses kam es zu vermehrter Acetaldehydbildung, was bei Erreichung einer bestimmten Konzentration eine Geschmacksveränderung im Wein zur Folge hatte. Mikroskopische Untersuchungen veranlaßten den Autor zu der Annahme, daß der Wein erneut in Gärung gekommen war, und daß generell Acetaldehyd nur im Zuge biologischer Vorgänge gebildet werden kann. Eine chemische Oxydation des Alkohols wird ausgeschlossen. AMERINE (1) stellt fest, daß Sauerstoffzufuhr während der Gärung zu wesentlich höheren Acetaldehydgehalten führt und zwar 6 - 7 mal höher als bei üblicher Vergärung. Die Tatsache, daß Acetaldehyd bei Zufuhr von Sauerstoff während der Lagerung und Gärung vermehrt gebildet wird, wird auch für Bier bestätigt (8, 14).

Eine Erklärung für die vermehrte Acetaldehydbildung bei Luftzufuhr ist in einer Arbeit von HOLZER und Mitarb. (44) zu finden und auch in dem Kapitel "Aerobe Phase" ausgeführt. Unter anaeroben Bedingungen verbraucht die Hefe den größten Teil des NADred zur Reduktion von Acetaldehyd zu Äthanol, bei der Aerobiose werden erhebliche Mengen über die Atmungskette dehydriert und dadurch der cytoplasmatische $NADH_2$ -Spiegel aerob wesentlich niedriger (um 50 %) als anaerob.

2.3. Acetaldehyd in Abhängigkeit von der Kellertechnik

Das Reifen der Trauben, die Aroma-, Säure- und Zuckerbildung in den Trauben sind Faktoren, die vom Wetter, von der Sorte, vom Boden und von der Düngung abhängen. Sie sind oft rein zufälliger Art und der Winzer kann sie, abgesehen von der Düngung, nicht ohne weiteres ändern. Sobald die Früchte aber geerntet sind, liegt es zum großen Teil in der Hand des Kellerwirts, ob ein mehr oder weniger ansprechendes Produkt daraus gewonnen wird. Die Möglichkeiten der Verarbeitung sind vielgestaltig und hängen zum großen Teil von dem Zustand des eingebrachten Gutes ab.

2.3.1. Maischeschwefelung

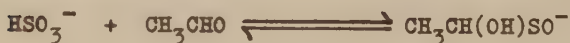
Die Maischeschwefelung ist als Sicherheitsmaßnahme gedacht. Jeder Kellerwirt muß bemüht sein, das Betriebsrisiko möglichst klein zu halten, indem er Most oder Maische vor jeglicher Art von Verderb schützt. Nach DITTRICH ist das nur durch eine relativ starke Schwefelung möglich (21). Die SO_2 -Gaben sollen Schutz vor allzu früher Bräunung bringen (53), sollen Faulstoffe geschmacksunwirksam machen und nicht zuletzt, wie bei DITTRICH (20) im Deutschen Weinbaukalender nachzulesen ist, vor einem Essigstich schützen. Abgesehen von den beschriebenen erwünschten Wirkungen hat die zur Maische zugesetzte schweflige Säure (SO_2) aber auch eine Wirkung auf die Menge an Acetaldehyd, die sich während der Gärung bildet, und zwar eine negative. RIBEREAU-GAYON (88), PAUL (76), KIELHÖFER und WÜRDIG (51), AMERINE (2) und WUCHERPENNIG (113) konnten feststellen, daß beim Zusatz von schwefliger Säure zum Most der Aldehydgehalt des Weines erheblich größer ist als ohne diesen Zusatz. Bei den Versuchen zeigte sich, daß zu Beginn der Gärung der Aldehydgehalt unmittelbar nach seiner Entstehung an SO_2 gebunden wird. Erst nachdem die freie SO_2 vollkommen gebunden ist, steht der Acetaldehyd für die während der Gärung ablaufenden Umsetzungen zur Verfügung. Nach AMERINE

(2) steht die Bildung des Bisulfit-Komplexes in Konkurrenz zur Äthanolbildung aus Acetaldehyd. Die Gleichungen Nr. 9 und 10 veranschaulichen die Reaktionen:

Gleichung 9:



Gleichung 10:



2.3.2. Gärstopp

Die Ergebnisse der Maische- oder Mostschwefelung ließen erwarten, daß auch der Zusatz von SO_2 während der Gärung zu einer vermehrten Aldehydbildung führt. KIELHÖFER und WÜRDIG (52) führten die entsprechenden Versuche durch und bestätigten die Annahme. Bei entsprechend hohen SO_2 -Gaben stieg der Acetaldehydgehalt auf die enorme Menge von 358 mg/l.

Will man anstatt der verlangsamten Gärung eine vollkommene Gärungsunterbrechung erreichen, dann muß die SO_2 -Gabe so hoch sein, daß die Enzymsysteme der Hefen schockartig inaktiviert werden. PEYNAUD und LAFOURCADE (80) benötigten 250 mg bzw. 350 mg/l SO_2 zum Stummachen bei ca 75 g/l Restzucker und 90 g/l Alkohol. Trotzdem nahm der Aldehydgehalt noch erheblich zu, wenn die Hefe vorher nicht abgetrennt wurde. Die Zunahme war nur gering bei Vorabstich und belief sich auf 0 bei vorherigem Separieren. KIELHÖFER und WÜRDIG (52) stellten im Gegensatz dazu fest, daß sich bei vollkommener Inaktivierung der Enzymsysteme kein Aldehyd mehr bildet. Sie erreichten mit 400 mg/l SO_2 in jedem Fall eine vollkommene Inaktivierung, während bei Kaltgärung und bei geringen Restzuckergehalten bereits 200 mg/l SO_2 genügten. Die vorhandene Hefemenge hatte dabei keinen Einfluß auf den not-

wendigen SO_2 -Zusatz. Die beschriebenen Versuche bezogen sich lediglich auf die Aldehydbildung nach SO_2 -Zusatz zum Hemmen oder vollkommenen Inaktivieren der Hefen. Man muß aber auch den zu diesem Zeitpunkt im Gärmedium freien Acetaldehydspiegel beachten. Wie die Abb. 3 zeigt, wird der Acetaldehyd am Anfang gestaut und langsam im Verlauf der Gärung abgebaut.

Abbildung 3

Acetaldehyd im Verlauf der Gärung in Traubenmost

Der gärende Wein enthält in jedem Falle noch mehr Acetaldehyd als der durchgegorene. In eigenen Versuchen konnte dazu festgestellt werden, daß bei 60 g/l Restzucker der Acetaldehydgehalt noch 48 mg/l beträgt, während der durchgegorene Wein nur noch 38 mg/l Acetaldehyd enthält. Abschließend kann man zur Gärhemmung und Gärunterbrechung mittels SO_2 sagen, daß der SO_2 -Gehalt in so behandelten Weinen wesentlich höher sein wird als in durchgegorenen und daß diese kellertechnischen Maßnahmen in keinem Falle zur Verringerung der SO_2 im Wein beitragen können.

2.3.3. Gärung unter Druck

Die Gärung im Hochdrucktank findet vor allem bei der Süßreservebereitung Anwendung. Der Konsument wünscht heute süßere Weine. Die vorhergegangenen Ausführungen zeigen aber, daß eine Süßhaltung mittels SO_2 -Stopp kaum empfehlenswert ist. Deshalb kam man zur Süßreserveverwendung. Normalerweise wird der Most dabei im Hochdrucktank angegoren, damit er den Mostton verliert. Die Hefe wird dann abgetrennt ohne daß CO_2 -Verluste auftreten. Enthält der angegorene Most noch 15 g/l CO_2 , so kommt es zu keiner neuen Hefevermehrung und zu keiner Alkoholbildung. In Bezug auf die gebildete Acetaldehydmenge stellte DITTRICH (21) fest, daß sie steil ansteigt und sich auf einen gleichbleibenden Wert einstellt, ohne wieder abzufallen. Der

Abb. 3

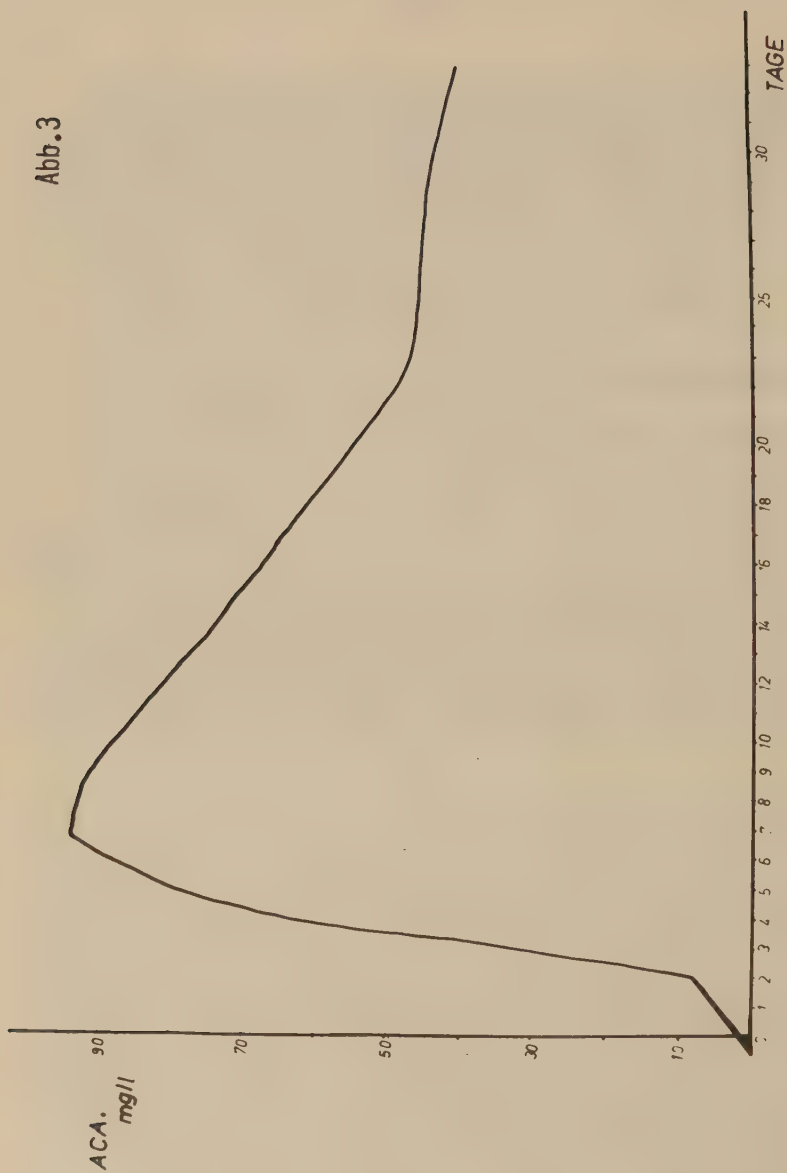


Abbildung 3 Acetaldehydbildung im Verlauf der Gärung im Traubenmost

Acetaldehyd bewegte sich zwischen 120 und 150 mg/l. Der Wert blieb über 2 Monate konstant, obwohl der Zuckergehalt in dieser Zeit von 55 auf 15 Grad Öchsle abnahm. Eine Erklärung sieht der Autor in der Hemmung der ADH durch die hohe CO_2 -Konzentration.

2.3.4. Nachgärung

Das Verhalten des Acetaldehydgehaltes bei der Nachgärung wurde in gewisser Hinsicht schon bei der Gärhemmung mittels SO_2 besprochen. Normalerweise wird der Wein beim ersten Abstich geschwefelt und damit der gesamte Rest Acetaldehyd abgebunden. Wenn der Wein dann erneut in Gärung kommt oder aber langsam nachgärt, dann wird zuerst die gesamte freie schweflige Säure vom Acetaldehyd abgefangen und es kommt erst später zur Umsetzung von Acetaldehyd zu Äthanol. Die zwingende Folge ist eine erneute Nachschwefelung.

2.3.5. Hochkurzzeiterhitzung

Die Hochkurzzeiterhitzung wird vor allem in der Fruchtsaftindustrie zur mikrobiologischen und enzymatischen Stabilisierung eingesetzt. Man versteht darunter die sehr rasche Erhitzung eines Produktes auf 85°C bis 90°C mit anschließender Abkühlung. Da in dieser Stabilisierung auch eine Aufgabe der SO_2 liegt, könnte das genannte Verfahren durchaus zu einer SO_2 -Einsparung führen. Nach JOHNSON (46) übertragen die Enzyme, z. B. die Polyphenoloxidasen, den Sauerstoff bevorzugt auf die schweflige Säure, wobei sie selbst denaturiert und ebenso wie die oxydierte schweflige Säure unwirksam werden. Nach Angaben von TROOST (107) kann bei Anwendung der Hochkurzzeiterhitzung wesentlich an schwefliger Säure eingespart werden. Ausführliche Versuche dazu wurden von PAUL (77) durchgeführt. Er stellt fest, daß es sich bei der Most-Oxydation nicht immer und ausschließlich um enzymatische Veränderungen

handelt, sondern teilweise auch um chemische Veränderungen. Zum SO_2 -Bedarf stellt er fest, daß er sich durch Hochkurzzeit-erhitzung nicht verringern läßt, wenn bereits im Stadium des Jungweines oder in der Zeit bis nach dem ersten Abstich auf einen Spiegel an SO_2 von 15-25 mg/l eingestellt wird. Er verspricht sich eine Einsparung bei einer späteren Einstellung des SO_2 -Spiegels.

2.3.6. Maischebewegung (Rühren)

Den Einfluß der Maischebewegung, d. h. des Rührens der Maische während der Gärung, haben verschiedene Autoren untersucht. FÖRNACHON (28) fand, daß sich Acetaldehyd anhäuft, wenn der Most oder Wein mit Hefekulturen geschüttelt wird. CROWTHER und TRUSCOTT (17, 18) stellten fest, daß häufiges Umpumpen von frisch vergorenem Wein zu erhöhten Acetaldehydgehalten führt. Nach 3 Wochen war in den beschriebenen Versuchen bereits ein Acetaldehydgehalt von 250 mg/l erreicht. Ausführliche Studien zu dem Thema wurden von OUGH und AMERINE (71) durchgeführt. Sie konnten mit Rühren und Sauerstoffdruck von etwa 1 atü eine Acetaldehydkonzentration von 1100 bis 1200 mg/l erreichen. Bei diesem Gehalt an Acetaldehyd stellte die Hefe die aerobe Gärung ein. Außerdem bemerkten sie, daß sich die Acetaldehydbildung proportional zur Hefe-Zell-Vermehrung verhält. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß Rühren des Weines, vor allem der dabei erfolgende Austausch von CO_2 gegen Luftsauerstoff, eher dazu geeignet ist, einen Wein vom Typ des Sherries zu erzeugen, als den Acetaldehydgehalt zu senken. Verallgemeinernd kann man dazu sagen, daß die Versuche für die Theorie im Kapitel "Aerobe Phase" sprechen. Sauerstoffzufuhr ist die Vorbedingung für vermehrte Tätigkeit in den Mitochondrien und für Zellwachstum und Vermehrung. Vermehrung und Mitochondrien-Tätigkeit bedingen aber einen hohen NADred-Verbrauch und damit eine Stauung des Acetaldehyds.

2.3.7. Gefäßverschluß

Da Acetaldehyd eine sehr leicht flüchtige Substanz mit einem Siedepunkt von 21° C ist, liegt die Vermutung nahe, daß Acetaldehyd während der Gärung, vor allem bei Temperaturen über 21° C, entweicht. Dann wäre auch der relativ niedrige Acetaldehydgehalt von Rotweinen, die eine Maischegärung im offenen Tank oder Faß durchmachen, erklärt.

AMERINE und OUGH (2) schienen sich in dieser Vermutung bestätigt zu sehen, als sie bei höheren Gärtemperaturen niedrigere Acetaldehydgehalte fanden. Sie mußten aber feststellen, daß trotz Gärtemperaturen von $20 - 30^{\circ}$ C nur sehr geringe Mengen an Acetaldehyd während der Gärung entwichen. Auch die Vergärung in einem oben ganz offenen Tank brachte die gleichen Ergebnisse wie die Gärung im geschlossenen Tank. Zum Zeitpunkt der stürmischen Gärung bildet sich so viel CO_2 , das den Sauerstoff austreibt, daß es keine Rolle spielt, ob der Gärtank offen oder geschlossen ist. Und wie die Versuche zeigen, ist es dabei nicht von Interesse, ob CO_2 direkt entweicht oder durch einen Gäraufsatz.

3. Eigene Versuche über Bildung und Abbau von Acetaldehyd

im Verlauf der Gärung

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Material

Hefe:

Die Weinhefe wurde aus dem Institut für Mikrobiologie der Hessischen Lehr- und Forschungsanstalt in Geisenheim bezogen. Es handelte sich um die Reinzuchthefen Geisenheim 1933 und Geisenheim 1949, zwei besonders gärkräftige Rassen.

Gärsubstrat:

Als Gärsubstrat dienten 1970er Traubenmost aus dem Institut für Kellerwirtschaft und eine synthetische Nährlösung, die sich folgendermaßen zusammensetzte:

Rohrzucker

K_2HPO_4 , di-Kaliumhydrogenphosphat

KH_2PO_4 , Kaliumdihydrogenphosphat

$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, Magnesiumsulfat

$CaCl_2 \cdot 7 H_2O$, Calciumchlorid

$NaCl$, Natriumchlorid

$(NH_4)_2SO_4$, Ammoniumsulfat

H_3PO_4 , Phosphorsäure

Die vollsynthetische Nährlösung erhielt je nach Fragestellung der einzelnen Versuche Vitamin- bzw. Stickstoffzusätze.

Gärgefäße:

Bei den Gärgefäßen handelte es sich um 2 l Steilbrustflaschen, 300 ml Erlenmeyer und Einhornröhrchen. Sowohl Steilbrustflaschen als auch Erlenmeyer wurden mit Gäraufsätzen aus Kunststoff verschlossen.

3.1.2. Methoden

Vorkultur der Hefe:

Vor der Durchführung der eigentlichen Versuche wurde die Reinzuchtheife auf Apfelsaft vermehrt. Dadurch bekommt man ein relativ einheitliches und dazu noch frisches Zellmaterial in der gewünschten Menge.

Vorbereitung der Gärversuche:

Die Gärgefäße wurden zunächst mit Wattestopfen versehen und bei

170° C 1 1/2 Std. im Trockenschrank sterilisiert. Danach wurden sie zu 2/3 mit der Nährlösung gefüllt und wieder mit dem Wattestopfen verschlossen. Um eine Durchfeuchtung des Stopfens bei der nachfolgenden Sterilisation zu vermeiden, wurde ein Stück Pergamentpapier darüber gebunden. Die gefüllten Kolben wurden dann 30 Min. im Autoklaven nachsterilisiert; und gleichzeitig die in Pergamentpapier eingepackten Gummistopfen der Gärspunde mitsterilisiert.

Nach dem Abkühlen wurde die Nährlösung unter Verwendung einer sterilen Pipette mit 2 % der gut aufgeschüttelten Hefe aus der Vorkultur beimpft und nun statt der Wattestopfen die Gummistopfen aufgesetzt. Die Gärspunde wurden in die Bohrungen eingesetzt und zu 1/3 mit Wasser gefüllt. Anschließend wurden die Proben bei der für den Versuch vorgesehenen Temperatur vergoren. Zur Bestimmung der "Gärintensität" wurde die Gewichtsabnahme beobachtet, die auf der Bildung von CO₂ beruht und gleichzeitig eine Aussage über die Äthanolbildung macht (98). Dazu wurde zu Beginn der Gärung das Gesamtgewicht der Gärgefäße auf 0,1 g genau bestimmt und als Startgewicht eingetragen. Die Wägungen wurden im Abstand von 24 Std. wiederholt und protokolliert. Die Gewichts differenzen sind ein Maß für die gebildete CO₂-Menge. Wenn keine Gewichtsveränderung mehr eintrat, war die Nährlösung durchgegoren. Die Gewichtsabnahme ist zwar ein gutes Maß für die Gärintensität, kann aber aufgrund der Ungenauigkeit nicht zur Äthanolbestimmung herangezogen werden. In parallel laufenden Gäransätzen wurde laufend Äthanol bestimmt.

Die enzymatische Äthanolbestimmung, wie sie in den Mitteilungen von BÖHRINGER (7) beschrieben ist, beruht auf dem Prinzip, daß Äthanol durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in Gegenwart des Enzyms Alkohol-Dehydrogenase (ADH) zum Acetaldehyd oxydiert wird. Die Reaktion ist in Gleichung 11 dargestellt.

Gleichung 11:



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite von Äthanol und NAD. Es kann jedoch durch NAD-Überschuß, alkalisches Milieu und Abfangen des Acetaldehyds durch Semicarbazid völlig auf die rechte Seite verschoben werden. Die während der Reaktion gebildete NADH-Menge ist äquivalent der Äthanolmenge. NADH ist Meßgröße und auf Grund seiner Absorption bei 340 nm bzw. 366 nm zu bestimmen.

Wenn große Gäransätze vorhanden waren, wurde der Alkoholgehalt durch Wägung bestimmt. Diese Bestimmung ist bei der Weinanalyse gebräuchlich und liefert recht genaue Ergebnisse. Sie ist nicht an das Vorhandensein aktiver Enzyme und frischer Reagenzien gebunden und aus diesem Grunde weniger anfällig und weniger aufwendig. Im Prinzip beruht die Bestimmung darauf, daß die relative Dichte des Destillates das Verhältnis angibt, in welchem das Gewicht irgendeines Raumteiles dieses Destillates zu dem Gewicht des gleichen Raumteiles Wasser steht. Die Berechnung des spezifischen Gewichts erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Spez. Gewicht} = \frac{\text{Gewicht Destillat}}{\text{Gewicht Wasser}} = d \frac{20^{\circ}}{20^{\circ}}$$

Der diesem Wert entsprechende Alkoholgehalt wird einer Tabelle entnommen.

Am Ende der Gärung wurde der Alkoholgehalt zur Kontrolle mit dem Ebullioskop gemessen. Diese Äthanolbestimmung beruht im Prinzip darauf, daß das Molekulargewicht einer Substanz aus der Siedepunkterhöhung bzw. -erniedrigung bestimmt wird. Speziell im Fall der Alkoholbestimmung wird der Siedepunkt des Wassers bei dem zur Zeit der Versuchs herrschenden atmosphärischen Druck mit dem Siedepunkt der zu untersuchenden alkoholhaltigen Lösung verglichen und von einer geeichten Skala der Alkoholgrad in Volumenprozent direkt abgelesen.

Außer Äthanol und CO_2 wurde vor allem Acetaldehyd bestimmt, und zusätzlich die Metaboliten, die in direktem Zusammenhang mit der Acetaldehydbildung stehen können: Pyruvat und Acetat.

Die Acetaldehydbestimmung wurde nach REBELEIN (84) kolorimetrisch durchgeführt. Diese Methode hat vor anderen, wie z. B. der enzymatischen und der Destillationsmethode den Vorteil, daß sie genau ist und in kurzer Zeit durchgeführt werden kann. Das Prinzip beruht darauf, daß Acetaldehyd mit Piperidin und Nitroprussidnatrium eine Violettfärbung gibt, deren Intensität kolorimetrisch bei 570 nm gemessen werden kann. Mit den Extinktionen wird der Acetaldehydgehalt aus der Eichkurve entnommen, die in Abb. 4 dargestellt ist.

Abbildung 4

Eichkurve Acetaldehyd

Die Pyruvat- und Acetatbestimmungen wurden enzymatisch durchgeführt. Wie man den Mitteilungen der Firma BÖHRINGER (7) entnehmen kann, beruht die Pyruvatbestimmung im Prinzip darauf, daß Pyruvat durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) in Gegenwart des Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) zu L-Lactat reduziert wird. Die Reaktion ist in Gleichung 12 dargestellt.

Gleichung 12:

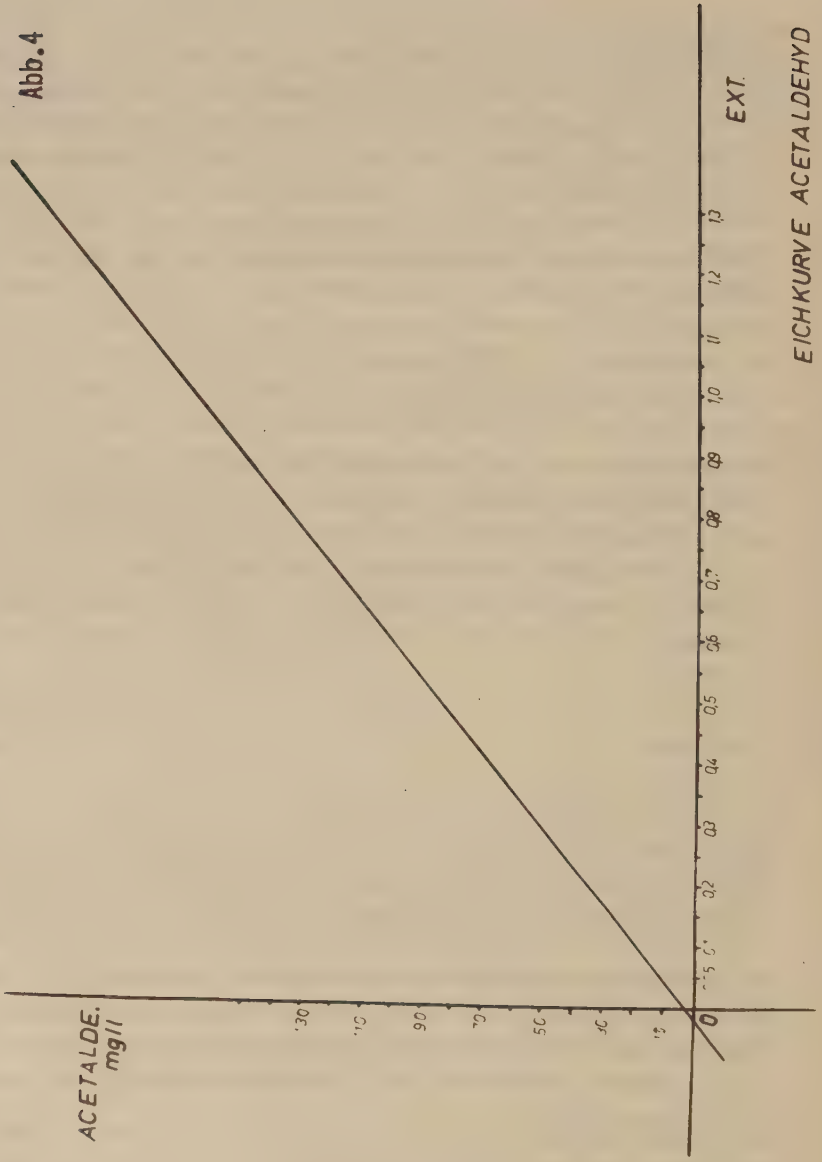


Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist äquivalent der Pyruvatmenge. NADH ist Meßgröße und auf Grund seiner Absorption bei 340 nm bzw. 366 nm zu bestimmen.

Die enzymatische Acetatbestimmung nach BÖHRINGER (7) beruht im Prinzip darauf, daß Acetat in der durch Acetat-Kinase (AK) katalysierten Reaktion durch Adenosin-5-triphosphat (ATP) zu Acetylphosphat phosphoryliert wird. Die Reaktion ist in Gleichung 13 wiedergegeben.

Gleichung 13:





EICHKURVE ACETALDEHYD

Das Gleichgewicht der Reaktion liegt dabei auf der Seite von Acetat und ATP. Da aus Acetylphosphat mit Hydroxylamin bei pH = 7 Acethydroxamsäure gebildet und so dem Gleichgewicht entzogen wird, verläuft die Reaktion quantitativ von links nach rechts. Diese Folgereaktion ist in Gleichung 14 wiedergegeben.

Gleichung 14:



Die Enolform der Acethydroxamsäure bildet mit FeCl_3 einen Farbkomplex, dessen Intensität der Acetatmenge im Bereich von 0,5 bis 2,5 Mol Acetat proportional ist und bei einer Wellenlänge zwischen 540 nm und 550 nm gemessen wird.

3.2. Einfluß der Polyphenole auf die Gärung und den Gehalt an Acetaldehyd.

Die Beobachtung von KIELHÖFER und WÜRDIG (52), daß bei Luftzutritt Acetaldehyd aus Äthanol gebildet wird und die Feststellung, daß in einem sauerstoffhaltigen Milieu große Mengen an Gärungsaldehyd entstehen, lenkten unsere Aufmerksamkeit auf das Redoxpotential der Weine und dessen Einfluß auf die Acetaldehydbildung. Das Redoxpotential eines Mostes steht aber neben anderen Stoffen in einem unmittelbaren Zusammenhang mit den Polyphenolen. Ein erhöhter Polyphenolgehalt könnte die Gärung von Anfang an in die reduktive Phase lenken und so den NADred-Verbrauch mehr zugunsten des Acetaldehydabbaus einsetzen. Die folgenden Versuche sollen der Klärung dieser Fragen dienen. Zu diesem Zweck wurde separierter Traubenmost in vier Bechergläser zu je 1,5 l verteilt. Anschließend wurden verschiedene Mengen eines Polyamidpulvers, Polyclar AT, in den Saft eingerührt. Die erste Probe wurde nicht behandelt, die zweite mit 0,25 g/l, die dritte mit 0,5 g/l und die vierte mit 2 g/l Polyamidpulver vermischt. Die Proben blieben 20 Min. unter öfterem Umrühren stehen und wurden anschließend durch ein Faltenfilter filtriert.

Ergebnisse:

Aus Tabelle 1 und Abbildung 5 sind die während der Gärung auftretenden Acetaldehydgehalte zu ersehen.

Tabelle 1

Acetaldehydbildung im Verlauf der Gärung in
Abhängigkeit von der Polyphenolkonzentration
im Most

Abbildung 5

Graphische Darstellung der in Tabelle 1 wiedergegebenen Werte

Die vier Proben enthielten bereits zu Beginn der Gärung etwa 2 mg Acetaldehyd pro l. Innerhalb der ersten 48 Stunden stieg der Acetaldehydgehalt nur um einige mg. Am 3. und 4. Tag war der größte Zuwachs zu verzeichnen, der am 8. Tag zum absoluten Maximum führte. Danach fiel der Gehalt an Acetaldehyd langsam ab und stellte sich auf das in der Abb. 5 dargestellte Niveau ein. Beim Vergleich der vier Proben untereinander stellt man fest, daß die Proben mit dem höchsten Polyphenolgehalt auch den absolut höchsten Acetaldehydgehalt hat, der sich am Ende der Gärung langsam dem der übrigen Proben annähert. Den zweithöchsten Acetaldehydgehalt hatte zu Beginn der Gärung die fast polyphenolfreie Probe, d. h. die Probe, die mit 2 g/l Polyclar AT behandelt worden war. Vom neunten Tag an hatte Probe Nr. 2, mit 0,25 g/l Polyclar AT behandelt, den zweithöchsten Gehalt an Acetaldehyd. Den geringsten Acetaldehydgehalt hatte im Verlauf der 30 Tage Probe Nr. 3, die mit 0,5 g/l Polyamidpulver behandelt worden war. Die Unterschiede im Acetaldehydgehalt sind im Verlauf der Gärung relativ groß, verringern sich aber zum Ende hin immer mehr und belaufen sich nach 34 Tagen auf 2 mg/l. Um diese - wenn auch kleinen - Unterschiede im Acetaldehydgehalt zu erklären, ist die Gärintensität, die aus der CO₂-Entwicklung

Tabelle 1

Acetaldehydbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Polyphenolkonzentration im Most

Probe-Nr.	Polyamid-Pulver g/l	Acetaldehyd mg / l									
		Tage 2.	5.	6.	7.	8.	9.	12.	13.		
1	unbehandelt	8	91	91	93	93	-	80	77		
2	0,25	8	69	76	79	82	73	67	65		
3	0,5	8	67	74	78	82	70	59	59		
4	2	8	76	80	82	88	73	65	64		
Probe-Nr.	Polyamid-Pulver g/l	Tage 14.	16.	19.	22.	27.	34.	41.	48.		
1	unbehandelt	70	68	57	47	47	39	38	33		
2	0,25	-	57	60	45	44	31	38	35		
3	0,5	56	52	47	-	39	36	33,5	31		
4	2	60	52	50	42	42	38	34	32		

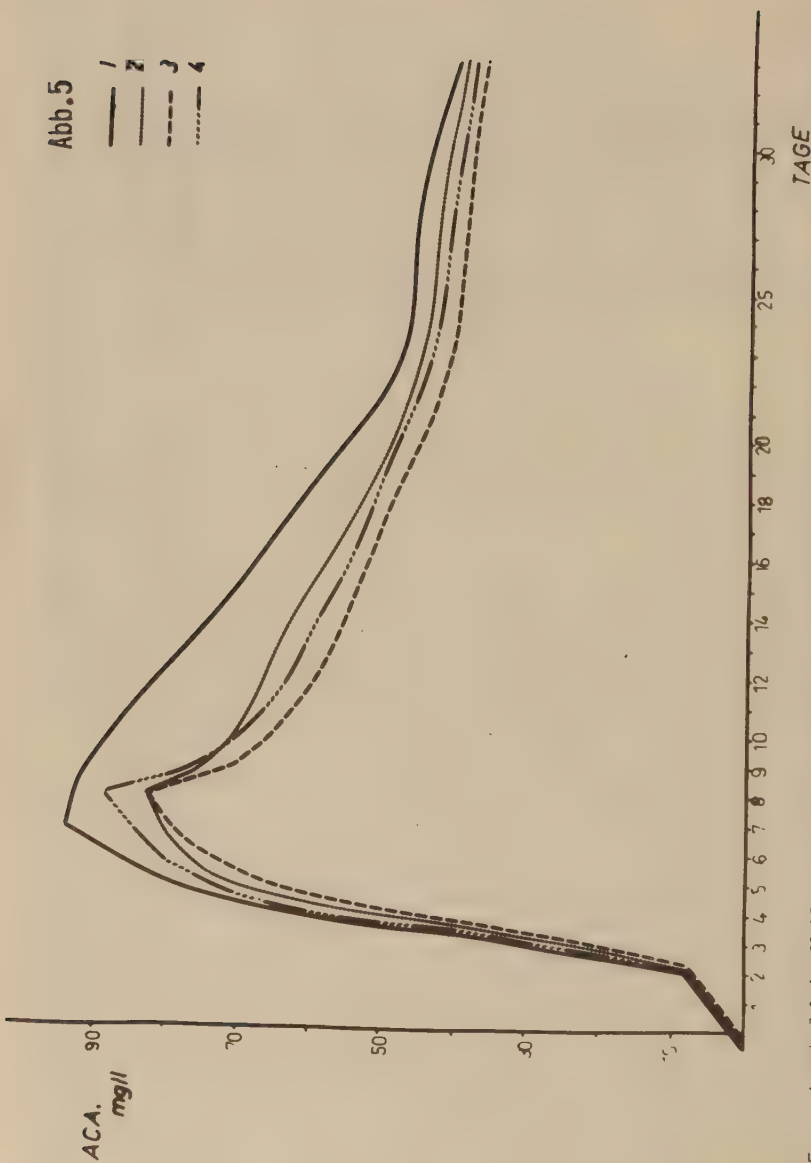


Abb. 5

Abbildung 5 Acetaldehydbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Polyphenolkonzentration des Mostes.

- 1 = unbehandelt
- 2 = 0,25 g/l Polyamid
- 3 = 0,5 g/l Polyamid
- 4 = 2 g/l Polyamid

im Verlauf der Gärung abgeleitet wird, zu beachten. Diese wurde durch tägliches Wägen bestimmt und die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 6 graphisch dargestellt.

Abbildung 6

CO₂-Bildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Polyphenolkonzentration des Mostes

Aufgrund der Meßwerte könnte man auf eine gegenseitige Abhängigkeit von Acetaldehyd- und CO₂-Bildung schließen.

Wie die Abbildung weiterhin zeigt, wird in der Probe Nr. 3 die größte Menge an CO₂ gebildet, während diese Probe andererseits den geringsten Acetaldehydgehalt hat. Probe Nr. 1 dagegen zeigt die größte Acetaldehydakkumulation und hat die geringste CO₂-Entbindung. Weiterhin ist bemerkenswert, daß der CO₂-Verlust in der Probe Nr. 4 vom neunten Tag an besonders zunimmt. Es kommt zur Überschneidung der Gärkurven.

Die gleichen Beobachtungen wie beim Gewichtsverlust durch CO₂-Entbindung macht man beim Verfolgen der Einzelwerte zur Äthanolbildung in Tabelle 2.

Tabelle 2

Äthanolbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Polyphenolkonzentration des Mostes

Die Werte zeigen, daß Probe Nr. 3 nicht nur die größte Gärintensität aufweist, sondern auch die größte Äthanolausbeute hat, während Probe Nr. 1 bei der geringsten Äthanolausbeute auch die geringste Gärintensität aufweist. Die Äthanolentwicklung im Verlauf der Gärung ist in Abb. 7 graphisch dargestellt.

Abbildung 7

Graphische Darstellung der in Tabelle 2 wiedergegebenen Werte

Abb. 6

- 1 - - - - -
- 2 -
- 3 - - - - -
- 4 - - - - -

CO₂ g/l

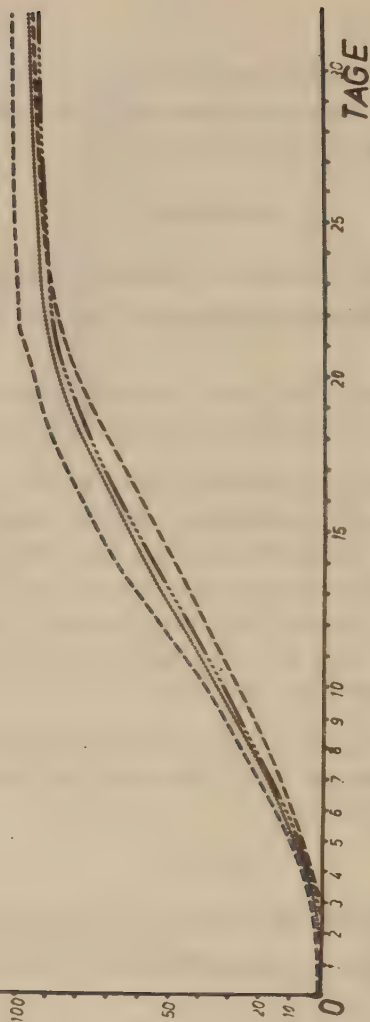


Abbildung 6 CO₂-Bildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Polyphenolkonzentration des Mostes.

- 1 = unbehandelt
- 2 = 0,25 g/l Polyamid
- 3 = 0,5 g/l Polyamid
- 4 = 2 g/l Polyamid

Tabelle 2

Äthanolbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Polyphenolkonzentration im Most

Probe-Nr.	Polyamid- Pulver g/l	Ä t h a n o l g/l										
		Tage 1.	2.	4.	5.	7.	8.	9.	12.	16.	19.	43.
1	unbe- handelt	1,5	3,7	7,0	8,7	20,0	21,0	41	45,6	50,2	59,0	100,2
2	0,25	2	4	8,6	10,8	20,4	23,3	42	47	53,8	63	95,4
3	0,5	2,4	5,1	10,3	13,2	21,4	25,2	44	51	66	73	100,2
4	2	2	4	8,4	10,4	20,8	22,0	37	51	59	63	100,9

Abb. 7

- 1 1
- 2 --- 2
- 3 --- 3
- 4 --- 4

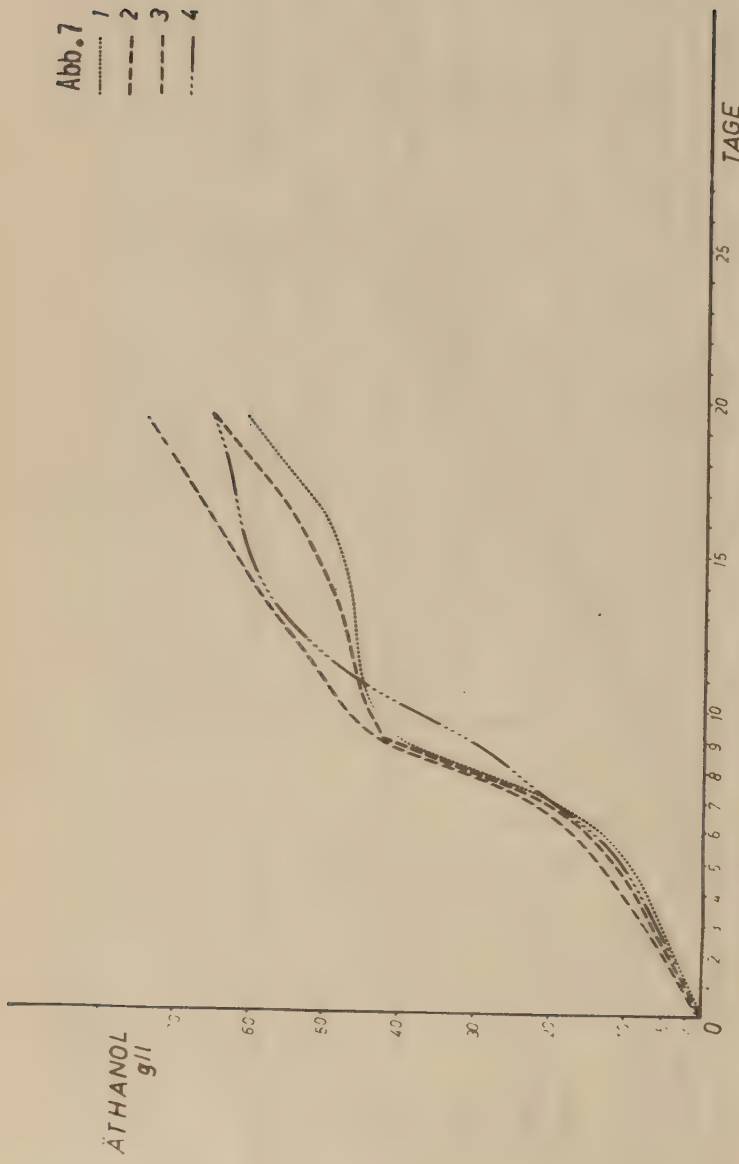


Abbildung 7 Äthanolbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Polyphenolkonzentration des Mostes.

- 1 = unbehandelt
- 2 = 0,25 g/l Polyamid
- 3 = 0,5 g/l Polyamid
- 4 = 2 g/l Polyamid

Die Abbildung zeigt, daß Äthanol kontinuierlich zunimmt und sein Maximum erreicht, wenn am Ende der Gärung der Zucker verbraucht ist oder der Stoffwechsel der Hefe durch andere Einflüsse zum Stillstand kommt.

Danach wurde der Pyruvatgehalt untersucht. Die Bestimmung dieses Stoffwechselproduktes ergibt Werte, die sich von denen des Acetaldehyds unterscheiden, und zwar nicht so sehr in der Größenordnung als vielmehr in Bezug auf die Proben untereinander. Tabelle 3 zeigt die einzelnen Gehalte dieses Metaboliten zu bestimmten Zeitpunkten im Gärverlauf.

Tabelle 3

Pyruvatbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit
von der Polyphenolkonzentration des Mostes

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

Abbildung 8

Graphische Darstellung der in Tabelle 3 wiedergegebenen Werte

Die Probe, die einerseits den höchsten Acetaldehydgehalt hat, weist andererseits den absolut niedrigsten Pyruvatgehalt auf, während in dem Substrat mit dem niedrigsten Acetaldehydgehalt und der größten Gärintensität auch der höchste Pyruvatgehalt festgestellt wurde. Ebenso wie der Acetaldehydspiegel stellt sich der Pyruvat Spiegel am Ende der Gärung auf ein bestimmtes Niveau ein, das mit einer Annäherung der Proben in Bezug auf Pyruvat verbunden ist.

Schließlich wurde auch der Acetatgehalt bestimmt. Aus Tabelle 4 und Abbildung 9 ist der Acetatgehalt der Proben im Verlauf der Gärung zu ersehen.

Tabelle 4

Acetatbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit
von der Polyphenolkonzentration im Most

T a b e l l e 3

Pyruvatbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Polyphenolkonzentration im Most

Probe-Nr.	Polyamid- Pulver g/l	P y r u v a t mg/l											
		Tage 2.	3.	5.	6.	7.	8.	9.	12.	13.	14.		
1	unbe- handelt	1	5	25	35,3	36,8	44,2	44,2	44	39,8			
2	0,25	2	8,0	34,3	53,0	57,5	57,5	66,3	61,9	53,0	48,6		
3	0,5	3,0	19,2	53	70,7	79,6	84,0	75,1	70,7	61,9	61,9		
4	2	2,2	11,5	43,8	61,8	70,7	75,1	70,7	57,5	53,0	57,5		
Probe-Nr.	Polyamid- Pulver g/l	Tage 16.	19.	22.	27.	34.	41.	48.					
1	unbe- handelt	44,2	44	26,5	30,94	30,94	30,94	26,52					
2	0,25	53	44	30,9	35,36	35,36	35,36	30,94					
3	0,5	61	48,6	35,4	35,36	35,36	30,94	26,52					
4	2	53	53,0	30,9	35,36	35,36	30,94	26,52					

Abb. 8

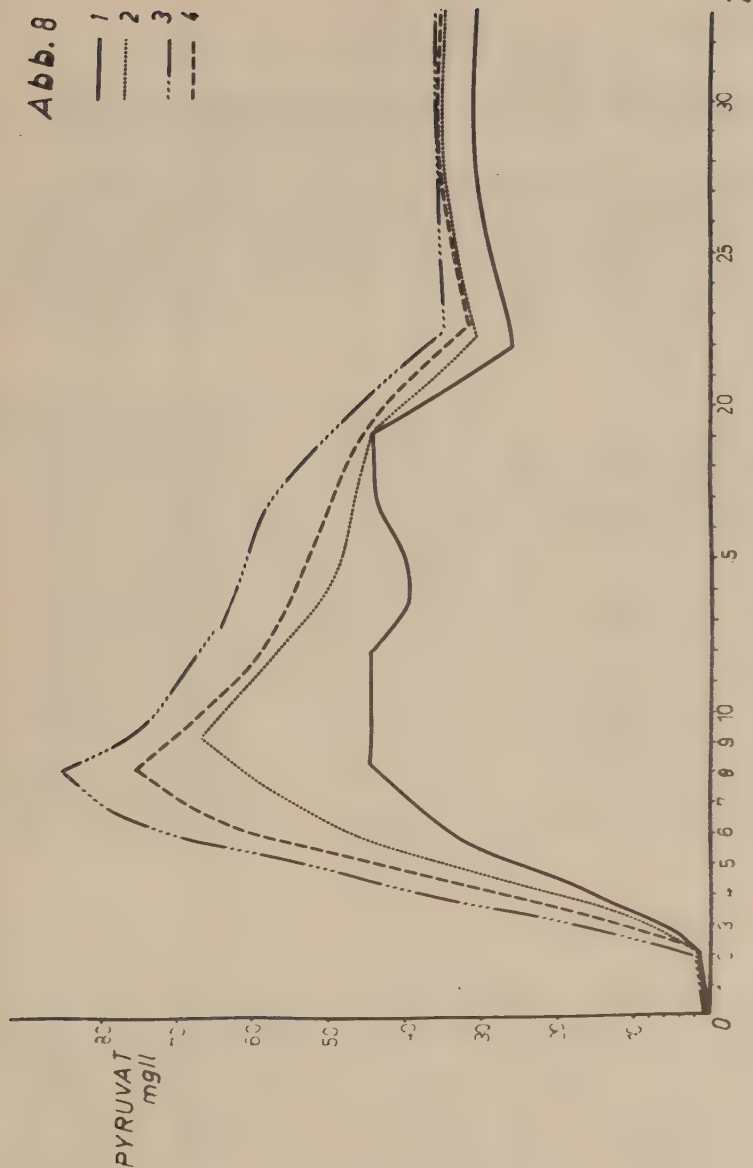


Abb. 8 Pyruvatbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Polyphenolkonzentration des Mostes.

- 1 = unbehandelt
- 2 = 0,25 g/l Polyamid
- 3 = 0,5 g/l Polyamid
- 4 = 2 g/l Polyamid

T a b e l l e 4

Acetatbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Polyphenolkonzentration im Most

Probe-Nr.	Polyamid- Pulver g/l	A c e t a t mg/l						
		Tage 2.	7.	8.	13.	14.	19.	27.
1	unbe- handelt	16,5	429	422	541	502	554	505
2	0,25	16,5	396	396	475	449	495	475
3	0,5	16,5	396	413	502	475	495	488
4	2	16,5	379	373	449	462	478	465

Abbildung 9

Graphische Darstellung der in Tabelle 4 wiedergegebenen Werte

Die Abbildung zeigt, daß der Acetatgehalt zu Beginn der Gärung steil ansteigt. Vom siebten Tag an ist ein geringer, aber kontinuierlicher Zuwachs zu verzeichnen, während der Acetatgehalt gegen Ende der Gärung sogar eine leicht abnehmende Tendenz aufweist.

Diskussion der Ergebnisse:

Wenn man die verschiedenen Kurven der im Verlauf der Gärung auftretenden End- und Zwischenprodukte zusammen betrachtet, kann man sagen, daß die Probe Nr. 3 am besten gärt. Höchstwahrscheinlich liegen in diesem Fall für die Hefen optimale Verhältnisse vor. Die Tabellen zeigen sehr deutlich, daß sich CO_2 - und Äthanolbildung gleich verhalten. Pyruvat hat in Bezug auf den Kurvenverlauf vieles mit Acetaldehyd gemeinsam, wie z. B. ein Maximum am achten Gärtag mit nachfolgendem Abfall und Einstellung auf ein bestimmtes Niveau. Zur Form der Acetaldehydkurve ist zu sagen, daß sie zu Beginn der Gärung ein Maximum durchläuft und am Ende abfällt. In Abbildung Nr. 3 ist die immer wieder auftretende Acetaldehydbildung im Verlauf der Gärung dargestellt.

Diese Kurve muß ein Maß für die Verfügbarkeit der Cosubstrate sein, denn nach Angaben von HOLZER (40) hängt der Acetaldehydgehalt in den einzelnen Stadien der Gärung von dem $\text{NADH} : \text{NAD}$ Verhältnis ab. Im Verlauf der rein anaeroben oder aeroben Gärung ist dieses Verhältnis konstant und der Gehalt an Acetaldehyd nimmt linear zu. Unter aeroben Bedingungen ist das Verhältnis $\text{NADH} : \text{NAD}$ wie 1 : 1100 und unter anaeroben Bedingungen ist das Verhältnis 1 : 400. Da aber bei der in der Praxis üblichen Gärung mehrere Phasen durchlaufen werden, kann auch der Gehalt an

Abb. 9

- 1 —————
- 2 —————
- 3 —————
- 4 - - - - -

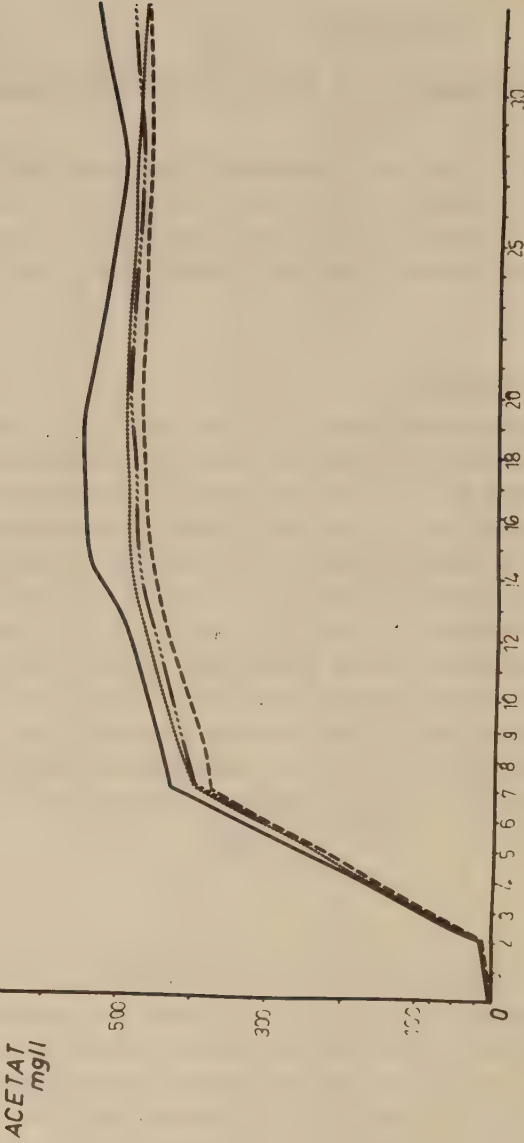


Abb. 9 Acetatbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Polyphenolkonzentration des Mostes

- 1 = unbehandelt
- 2 = 0,25 g/l Polyamid
- 3 = 0,5 g/l Polyamid
- 4 = 2 g/l Polyamid

Acetaldehyd nicht mehr linear zunehmen.

Durch den Übergang von einer aeroben zu einer anaeroben Phase kommt es zu Veränderungen in den NADH Konzentrationen und damit zu Abweichungen von der Linearität der Acetaldehydkurve. Die Gleichung Nr. 15 zeigt die Veränderung der Acetaldehydkonzentration in Richtung Äthanol.

Gleichung 15:



In Abhängigkeit vom Massenwirkungsgesetz unter Einführung der Gleichgewichtskonstanten K wird die Gleichung in folgender Form geschrieben:

$$\frac{(CH_3CHO) \times (NADH)(H^+)}{(CH_3CH_2OH) \times (NAD^+)} = K$$

Nach CH_3CH_2OH aufgelöst, lautet sie folgendermaßen:

$$(CH_3CH_2OH) = \frac{(NADH)(H^+) \times (CH_3CHO)}{(NAD^+) \times K}$$

Wenn man diese Gleichung nun in linearer Form schreibt $y = bx$ mit CH_3CH_2OH als y und CH_3CHO als x und $\frac{(NADH)}{(NAD^+)} \times \frac{(H^+)}{K}$ als b, dann müssen die Werte für Alkohol und Acetaldehyd, gegeneinander aufgetragen, eine Gerade ergeben; vorausgesetzt, daß das Verhältnis von NADH : NAD konstant ist. Das Verhältnis von $H^+ : K$ verändert sich im Verlauf der Gärung kaum und kann vernachlässigt werden. (2) Umgekehrt sind Abweichungen von der Geraden auf Veränderungen im NADH : NAD Verhältnis zurückzuführen. In Abbildung 10 sind die Ausführungen graphisch dargestellt.

Abbildung 10

Das Verhältnis von Acetaldehyd zu Äthanol
im Verlauf der Gärung

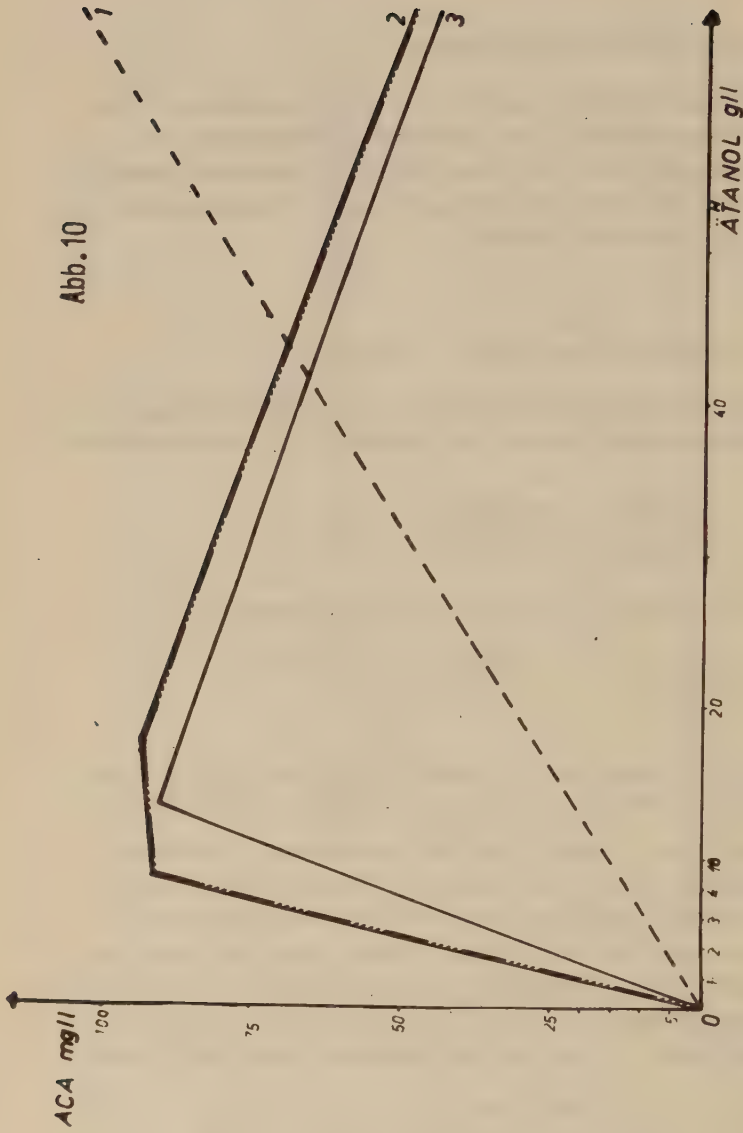


Abb. 10 Das Verhältnis von Acetaldehyd zu Äthanol
1 = hypothetische Kurve nach Holzer
2 und 3 = Kurven bei der Vergärung von Traubenmost

In Kurve 1 ist die Menge an Acetaldehyd gegen die Menge an Alkohol in jedem Stadium der Gärung unter konstanten Bedingungen aufgetragen. In Kurven 2 und 3 sind die praktisch auftretenden Mengen gegeneinander aufgetragen. Je größer die Abweichung von der Geraden ist, desto größer muß aufgrund der gemachten Ausführungen die verfügbare NADH Menge im Verhältnis zu NAD sein. Zum Pyruvat ist zu sagen, daß das Maximum und der folgende Abfall in der Kurve, wie man später sehen wird, sowohl auf mangelhafte Thiaminversorgung als auch auf eine schwache Pyruvat-decarboxylaseaktivität zurückzuführen sind (45).

Auch diese Abbildung zeigt, daß die Form der einzelnen Kurven nicht von dem generellen Bild abweicht. Trotzdem unterscheiden sich die einzelnen Proben voneinander. Die Probe, die die geringste CO_2 -Menge bildet, den geringsten Äthanolgehalt und den höchsten Acetaldehydgehalt aufweist, hat den niedrigsten Pyruvatgehalt. Nach THEN und RADLER (105) ist ein niedriger Pyruvatgehalt bei gleichzeitig hohem Acetaldehydgehalt auf eine hohe Pyruvatdecarboxylaseaktivität zurückzuführen. In diesem Fall müßte aber auch die gebildete CO_2 -Menge entsprechend hoch sein. Im Falle der höchsten Pyruvatmenge bei gleichzeitig niedrigstem Acetaldehydgehalt hieße das, daß die Aktivität der Pyruvatdecarboxylase gering ist. Da aber in diesem Fall gleichzeitig die größte CO_2 -Bildung zu verzeichnen ist, kann diese Erklärung nicht zutreffen. Die Unterschiede im Acetaldehydgehalt der 4 Proben können auf verschiedene Gärintensitäten der Proben, d. h. auf eine mehr oder weniger starke Hemmung aller Gärenzyme zurückzuführen sein. Eine leicht gehemmte aerobe Phase bedingt sekundär eine Hemmung der anaeroben Phase, die wiederum verminderte NADH-Werte zur Folge hat. Geringe NADH-Werte sind ein Grund für hohe Acetaldehydgehalte. Die allgemein geringeren Enzymaktivitäten führen andererseits zu kleineren Pyruvat-, CO_2 - und Äthanolkonzentrationen. Dagegen führt die sehr aktive Gärung mit hoher CO_2 -Bildung auch zu guten Äthanolausbeuten und zu verminderter Acetaldehydakkumulation.

Sehr interessant sind die nach 30 Tagen gemessenen Werte. In Bezug auf Pyruvat- und Acetaldehyd kann man sagen, daß sich die vier Proben am Ende der Gärung kaum noch unterscheiden. Geringere Enzymaktivitäten führen nach entsprechend längerer Zeit zu demselben Ergebnis wie die höheren nach entsprechend kürzeren Zeiten. Der Gehalt der Polyphenole scheint die Gärung etwas zu hemmen, führt aber schließlich zu demselben Ergebnis wie die Gärung im polyphenolfreien Medium. Die unterschiedlichen Acetaldehydgehalte der Weine können aber nicht durch die verschiedenen Polyphenolgehalte erklärt werden.

3.2. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Acetaldehydbildung

Nach SCHANDLER (94) ist die optimale Wasserstoffionenkonzentration für die verschiedenen Hefestämme recht unterschiedlich. Bei der Gattung *Saccharomyces* liegt die unterste Grenze zwischen pH 2 und 2,4, die oberste zwischen pH 11,8 und 12. BAVISOTTO und Mitarbeiter (4) beobachteten, daß die Acetaldehydbildung bei der Gärung mit einem Anfangs-pH von 4,8 und 5,8 im Gegensatz zu einem Anfangs-pH von 5,2 gehemmt wurde. Normalerweise wird die höchste Alkoholausbeute bei einem pH-Wert zwischen 3 und 4 erreicht. Wenn der pH-Wert von 4 überstiegen wird, kommt es allmählich zu vermehrter Glycerinbildung, die von pH 5 an stark zunimmt. Auch ist die Pyruvat-Decarboxylase in alkalischer Gärung weniger aktiv als in saurer und dadurch die anfallende Acetaldehydmenge geringer. Nach KIELHÖFFER und WÜRDIG (52) hat der Säuregrad des Mostes keinen Einfluß auf die Acetaldehydmenge. Im Gegensatz dazu hört man aber häufig aus Kreisen der Praxis und die statistischen Ergebnisse sprechen ebenfalls dafür, daß der Wein in südlichen Ländern ein relativ kleines SO_2 -Bedürfnis hat und demzufolge wenig Acetaldehyd enthält, während der Wein in den nördlichen Weinbauregionen mit hohen Säuregraden auch einen hohen SO_2 -Bedarf aufgrund hoher Acetaldehydgehalte hat. Aufgrund dieser Widersprüche machten wir es uns zur Aufgabe, in den folgenden Ver-

suchen mit vollsynthetischen Nährmedien unter Ausschaltung unbekannter Faktoren die Acetaldehydbildung in Abhängigkeit vom pH-Wert zu untersuchen. Es wurde ein Versuch in Einhorn-Röhrchen durchgeführt, dessen Ergebnis für den pH-Bereich des Hauptversuchs entscheidend war.

Als Gärmedium diente eine vollsynthetische Nährlösung. Gegenüber dem natürlichen Substrat hat diese Lösung den Vorteil, daß sie genau definiert und in dieser Zusammensetzung wieder herzustellen ist.

Herstellung der synthetischen Nährlösung:

162,5 g Rohrzucker oder Glucose, Fructose im Verhältnis 1 : 1,
1 g di-Kaliumhydrogenphosphat,
0,5 g Kaliumdihydrogenphosphat,
0,5 g Magnesiumsulfat,
0,1 g Calciumchlorid,
0,1 g Natriumchlorid und
5 g Ammoniumsulfat

wurden in 1 l Wasser gelöst. (Für den Hauptversuch wurde die fünffache Menge hergestellt). Die Lösung wurde mit konzentrierter Phosphorsäure auf den pH-Wert von 2,25 am pH-Meter eingestellt. Es wurden 2 ml benötigt. Anschließend wurde mit 10 % iger Natronlauge am pH-Meter auf pH 2,5 abgestumpft. Von der Lösung wurden 100 ml weggenommen und der Rest auf pH 3 eingestellt.

Auf diese Weise wurden 8 Proben von je 100 ml hergestellt, die folgende pH-Werte hatten:

2,5 - 3,0 - 3,5 - 4,0 - 4,5 - 5,0 - 6,0 - 7,0 -

Von den Proben wurden je 30 ml abpipettiert und mit jeweils 0,5 ml einer Hefe-Vorkultur der Rasse Geisenheim 1949 vermischt. Die Mischungen (30,5 ml) wurden in Gärröhrchen gefüllt und bei 27° C bebrütet. Da die Möglichkeit einer sehr schnellen nicht kontrollierbaren Gärung bestand, wurde aus Sicherheitsgründen eine zweite Gärreihe aufgestellt, die genauso hergestellt, aber nur mit Hefespuren beimpft wurde.

Für die Hauptversuche wurden 5 l Nährlösung hergestellt, die am pH-Meter mit konzentrierter Phosphorsäure auf pH 2,75 eingestellt wurden. 1,5 l wurden in eine sterilisierte Steilbrustflasche gefüllt und mit einem Wattestopfen verschlossen. Der Rest wurde am pH-Meter mit 10 %-iger NaOH auf pH 3,5 abgestumpft und wieder 1,5 l davon in eine zweite Steilbrustflasche gefüllt. Der Rest wurde auf pH 4 eingestellt und 1,5 l davon abgefüllt. Die drei Ansätze wurden dann bei 120° C sterilisiert. Nachdem sie abgekühlt waren, wurden die Gärsubstrate mit je 20 ml einer Hefesuspension der Reinzuchtheife Geisenheim 1949 beimpft. Direkt nach dem Beimpfen wurden mit einer sterilen Pipette Proben von je 5 ml entnommen, um Acetaldehyd sowie Pyruvat in der Ausgangslösung zu bestimmen. Auf die Acetatbestimmung wurde in diesem Versuch verzichtet, da Ergebnisse früherer Versuche keinen Zusammenhang zwischen Acetat und Acetaldehydgehalt erkennen ließen. Auch umfangreiche statistische Angaben scheinen diese Annahme zu bestätigen; obwohl die gebräuchliche Methode zur Bestimmung der flüchtigen Säure nicht spezifisch für Essigsäure ist und die statistischen Werte nur mit Vorbehalt herangezogen werden können.

Äthanol wurde pyknometrisch bestimmt und die CO₂-Entwicklung in diesem Versuch nicht berücksichtigt. Der Gewichtsverlust, der ein Maß für die CO₂-Bildung ist, macht lediglich Aussagen über die Gärintensität in den verschiedenen Stadien der Gärung. Da aber die regelmäßig durchgeführte Alkoholbestimmung ebenfalls Aussagen über die Gärintensität zuläßt, kann die CO₂-Bestimmung nur als Kontrolle angesehen werden.

Die in Steilbrustflaschen durchgeführten Gärversuche mit jeweils 1,5 l Gärsubstrat waren bei pH 2,75; pH 3,5 und pH 4 durchgeführt worden, da die Vorversuche in diesen Bereichen, die auch der Gärung in der Praxis entsprechen, aussagekräftige Ergebnisse versprochen.

Ergebnisse des Vorversuchs:

In Abbildung 11 ist die CO₂-Bildung in zeitlichen Abständen in

den Einhornröhrchen wiedergegeben.

Abbildung 11

CO₂-Bildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von
der Wasserstoffionenkonzentration des Substrates

Der Wert bei pH 7,8 konnte nicht berücksichtigt werden, da CO₂ im alkalischen Medium in wesentlich geringerem Maße entbunden wird als im sauren. Die Probe mit einem pH-Wert von 2,5 geriet nicht in Gärung, sodaß keine Gärkurve aufgestellt werden konnte. Im Anfangsstadium der Gärung, d.h. bis 40 Std. nach der Hefe-einsaat, wies die Probe mit pH 4 die größte Gärintensität auf, gefolgt von der Probe mit pH 3,5. In fast gleichen Größenordnungen bewegten sich die Proben mit einem pH-Wert von 3,0, 4,5 und 5,0, während die Probe mit pH 6 etwas abfiel. Nach einer Gärdauer von 42 Std. schienen sich die Verhältnisse zu ändern. Die Probe mit pH-Wert 3 zeigte die größte CO₂-Entbindung, gefolgt von den Proben mit pH-Wert 6 und 4 und nahe beieinander liegend die Proben mit pH-Wert 3,5, 4,5 und 5,0.

In Abbildung 12 ist der Acetaldehydgehalt in den Untersuchungsproben dargestellt.

Abbildung 12

Acetaldehydbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit
von der Wasserstoffionenkonzentration des Substrates

Wie die Abbildung zeigt, haben die Proben in der Nähe des alkalischen und im alkalischen Bereich den absolut höchsten Acetaldehydgehalt. Der niedrigste Gehalt wurde in der Probe mit einem pH-Wert von 4 gemessen. Mit Änderungen der CO₂-Entwicklung gibt es zwar auch Änderungen im Acetaldehydgehalt, die Tendenz bleibt aber erhalten.

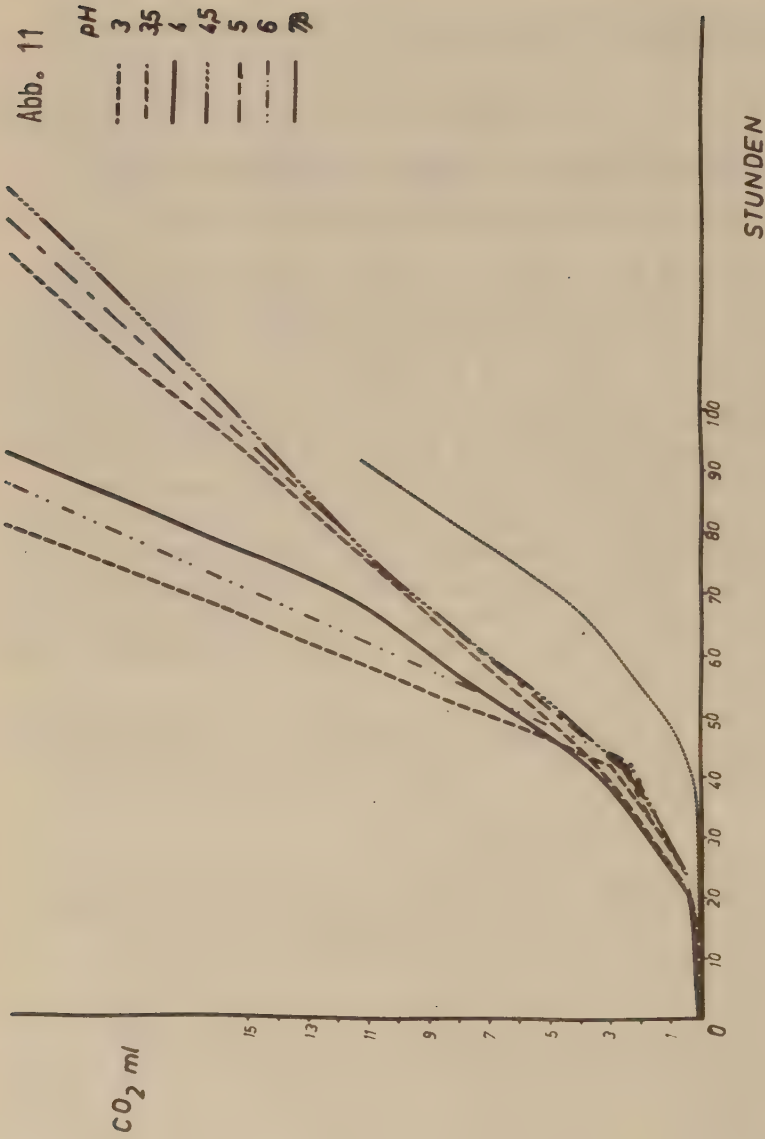


Abb. 11 CO₂-Bildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Substrates

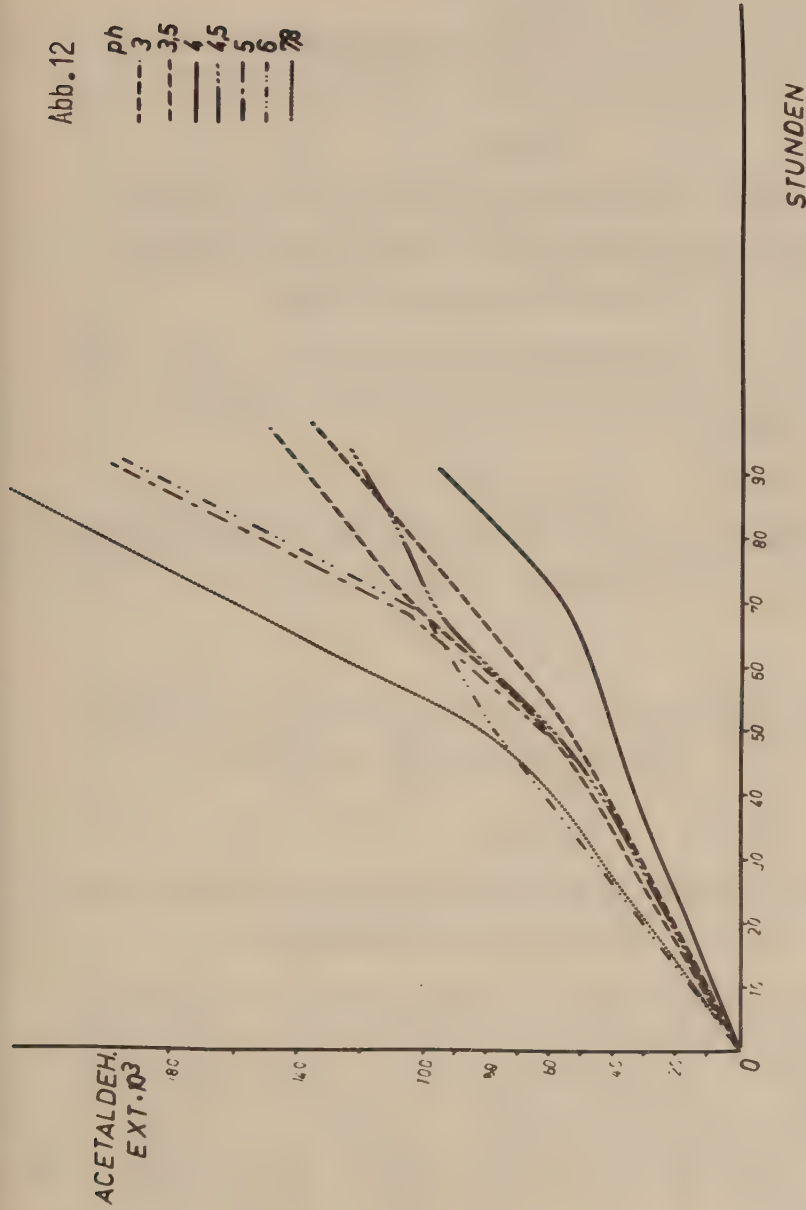


Abb. 12 Acetaldehydbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Substrates

Ergebnisse des Hauptversuchs:

Einzelwerte zu den Ergebnissen des Hauptversuchs sind aus Tabelle 5 zu ersehen.

Tabelle 5

Äthanol-, Acetaldehyd- und Pyruvatbildung im Verlauf
der Gärung in Abhängigkeit von der Wasserstoffionen-
konzentration des Substrates

Außerdem ist die Entwicklung der verschiedenen Stoffwechselprodukte im Verlauf der Gärung auch in den Abbildungen 13, 14 und 15 graphisch dargestellt worden.

Abbildung 13

Alkoholbildung in Abhängigkeit von der Wasserstoffionen-
konzentration des Substrates

Abbildung 14

Acetaldehydbildung in Abhängigkeit von der Wasserstoff-
ionenkonzentration des Substrates

Abbildung 15

Pyruvatbildung in Abhängigkeit von der Wasserstoffionen-
konzentration des Substrates

Wie die Abbildung 13 zeigt, gärt die Probe Nr. 1 sehr langsam und hat nach einem Monat erst 45 g/l Alkohol gebildet, während die Proben Nr. 2 und 3 nach dieser Zeit als durchgegoren bezeichnet werden können. Die Gärintensität ist in den ersten 15 Tagen der Gärung im Gegensatz zur Traubenmostvergärung etwa genauso groß wie in den letzten 15 Tagen. Dies ist äußerst ungewöhnlich und deutet auf eine anfängliche Gärhemmung hin.

T a b e l l e 5

Äthanol-, Acetaldehyd- und Pyruvatbildung im Verlauf der Gärung
in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Substrates

Tage	Äthanol g/l			Acetaldehyd g/l			Pyruvat g/l		
	Probe-Nr.			Probe-Nr.			Probe-Nr.		
	1 pH 2,75	2 pH 3,5	3 pH 4,0	1 pH 2,75	2 pH 3,5	3 pH 4,0	1 pH 2,75	2 pH 3,5	3 pH 4,0
1	1,2	2,0	2,1	8	9,5	9,5	35,4	26,5	30,9
1 1/2	-	-	-	9,5	10,5	11,5	-	-	-
2	7,4	10,2	9,6	12	15	18	48,6	77,3	84
2 1/2	-	-	-	12,5	17	25,5	-	-	-
3	9,6	12,3	12,3	15	17,5	19	75,1	123,8	137,0
4	-	-	-	20	20,5	22	-	-	-
5	-	-	-	22	25,5	25,5	-	-	-
6	14,5	17,7	17,7	24	29	29	110,5	207,7	234,3
7	-	-	-	26	29	29	-	-	-
8	19,4	22,1	22,1	30	36	39	123,8	227,6	225,4
10	-	22,7	25,5	32	40	44	123,8	216,6	225,4
13	21,0	32,4	32,9	43	73	67	123,8	212,2	225,4
16	27,2	35,9	38,2	56,5	79	71	119,3	194,5	207,7
21	-	-	-	56,5	33	73	119,3	168,0	190,1
30	45,9	74	74	77	69,5	69,5	110,5	123,8	141,4
49	-	-	-	73	71	64	-	-	-
64	-	-	-	73	70	62	-	-	-

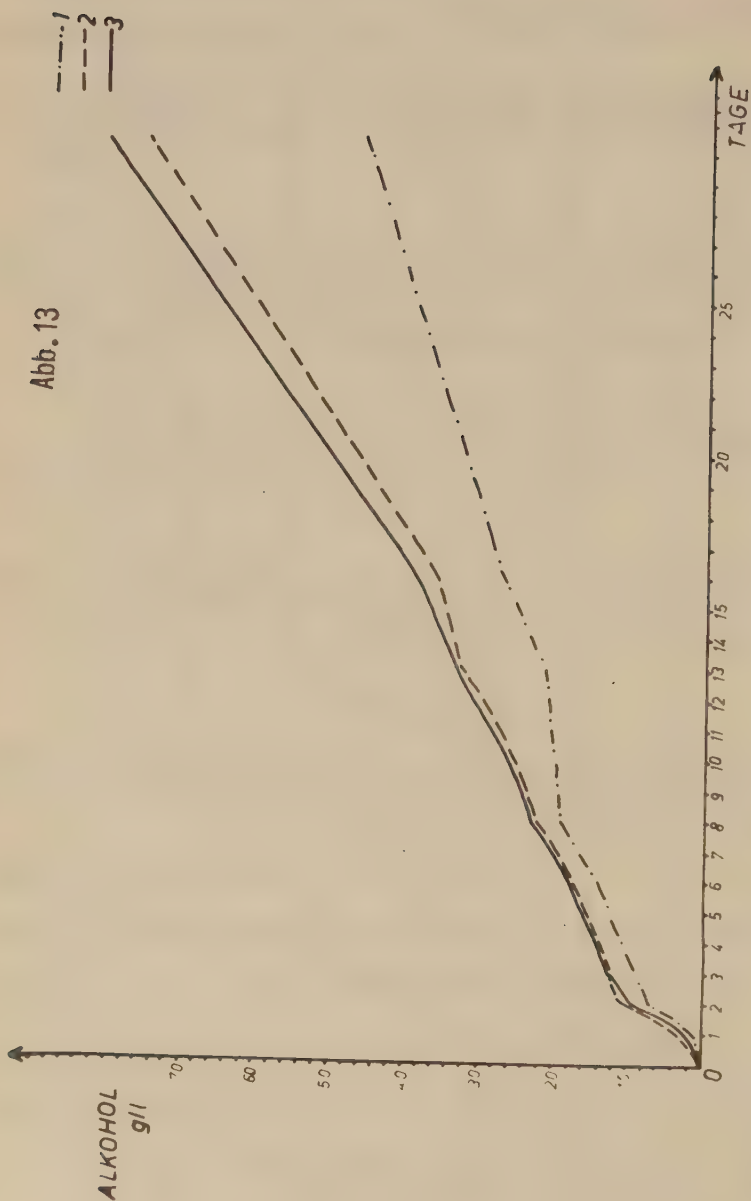


Abb. 13 Alkoholbildung in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Substrates
 1) = pH 2,75 , 2) = pH 3,5 3) = pH 4

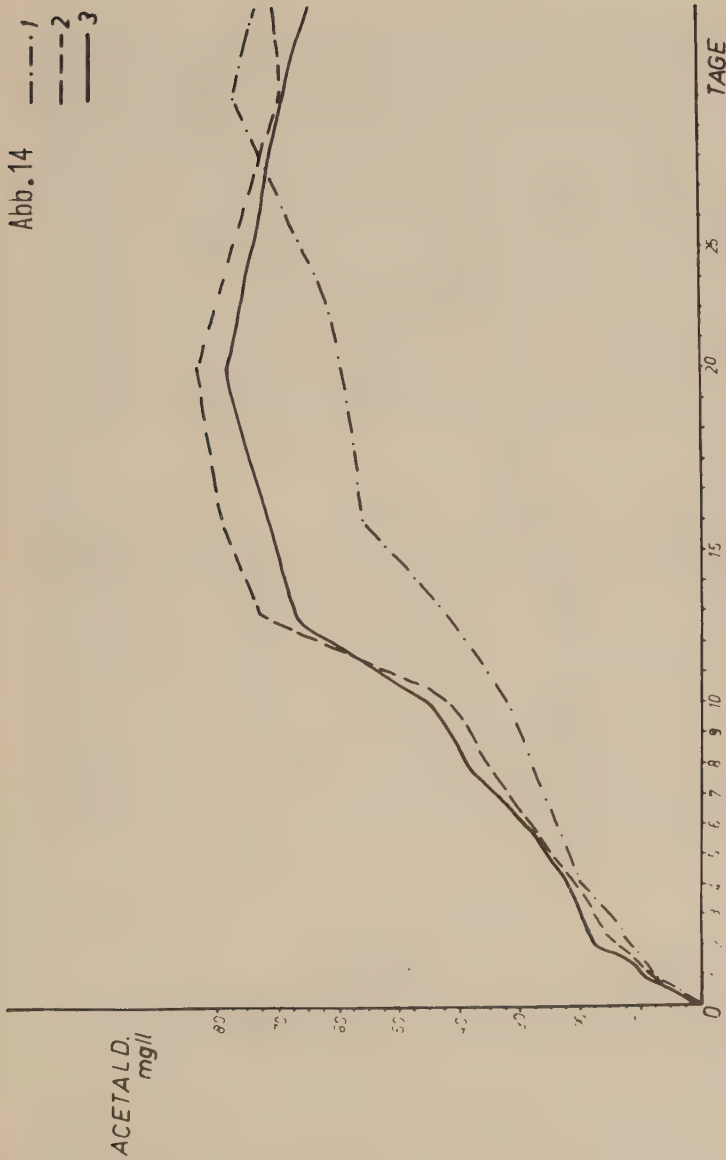


Abb. 14 Acetaldehydbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Substrates

1) = pH 2,75, 2) = pH 3,5, 3) = pH 4

Abb. 15

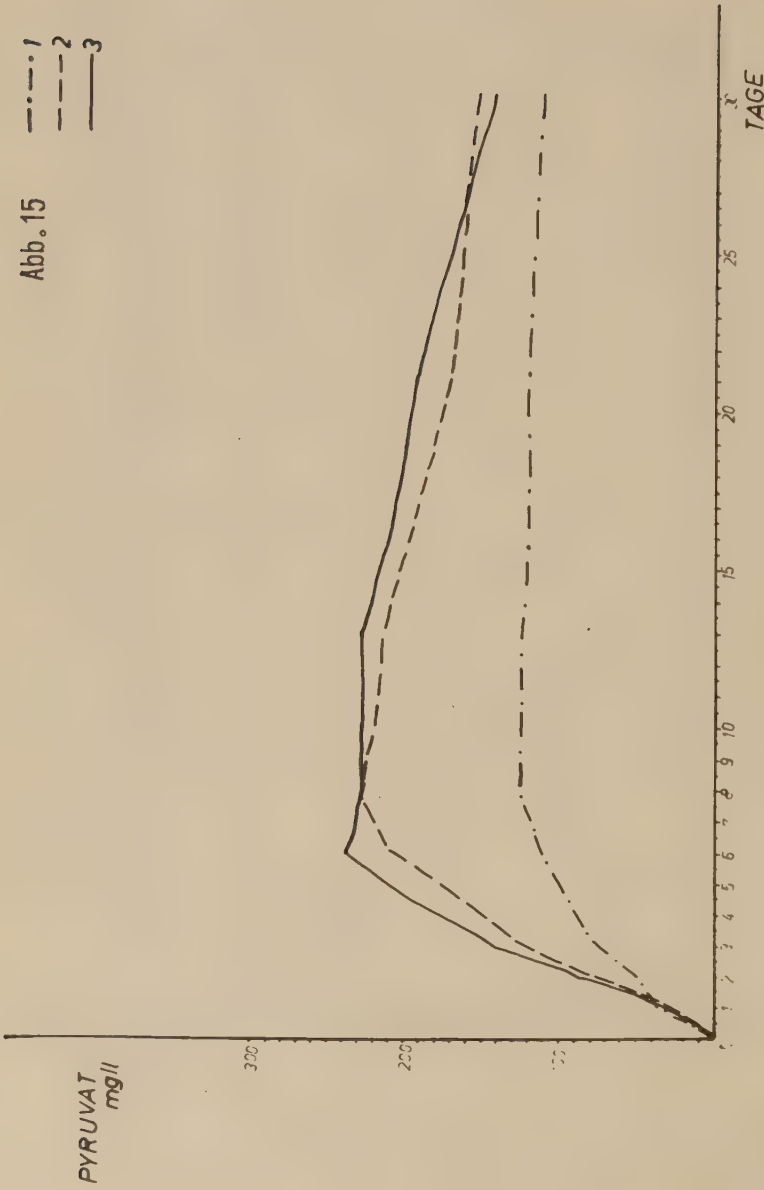


Abb. 15 Pyruvatbildung in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Substrates

1 = pH 2,75
2 = pH 3,5
3 = pH 4

Der Acetaldehydgehalt nimmt im vollsynthetischen und wuchsstofffreien Substrat nur langsam zu. Die Tabelle und die Abbildung zeigen, daß es erst mitten im Gärablauf zu einem Maximum kommt. Dieser erreichte Acetaldehydgehalt fällt nicht wie gewöhnlich steil ab, sondern verringert sich nur sehr langsam und liegt nach 30 Tagen noch bei durchschnittlich 72 mg/l. Die stark gehemmte Probe mit einem pH-Wert von 2,75 hat nach 30 Tagen Gärdauer dieses beschriebene Maximum noch nicht einmal erreicht, und es ist fraglich, ob der Acetaldehydgehalt dieser Probe jemals eine abnehmende Tendenz zeigen wird. Absolut ist der Acetaldehydgehalt dieser Probe niedriger als der der beiden anderen Proben, in Abhängigkeit vom Äthanolgehalt aber höher als in Probe Nr. 3. Bis zum 13. Tag nimmt der Acetaldehydgehalt noch relativ schnell zu.

Aus Abbildung 15, die den Pyruvatgehalt im Gärverlauf zeigt, geht hervor, daß Probe Nr. 1 bei einem pH-Wert von 2,75 den niedrigsten Gehalt an Pyruvat hat, während Proben Nr. 2 und 3 kaum Unterschiede zeigen. Im Gegensatz zur Acetaldehydbildung wird das Maximum schon sehr früh, nämlich am 6. Tag erreicht. Aber der Wert fällt danach kaum ab, sondern bleibt relativ konstant; vor allem in der Probe mit dem pH-Wert von 2,75. Während bei der Vergärung von Traubenmost das Pyruvat- und das Acetaldehydmaximum größenordnungsgemäß in demselben Bereich liegen, steigt der Pyruvatgehalt im synthetischen Medium auf das 3-fache an.

Das Alkohol : Acetaldehyd - Verhältnis ist in Abbildung 16 dargestellt.

Abbildung 16

Das Verhältnis von Alkohol zu Acetaldehyd in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Substrates

Die Proben Nr. 2 und 3 zeigen Acetaldehydzunahme bis durchschnittlich 37 g/l Alkohol, der nach 15 Tagen erreicht ist. Danach erfolgt eine minimale Abnahme bis zum Schluß der Gärung. Die Probe Nr. 1 (pH 2,75) ist bei 45 g/l Alkohol noch im Zunahmebereich für Acetaldehyd.

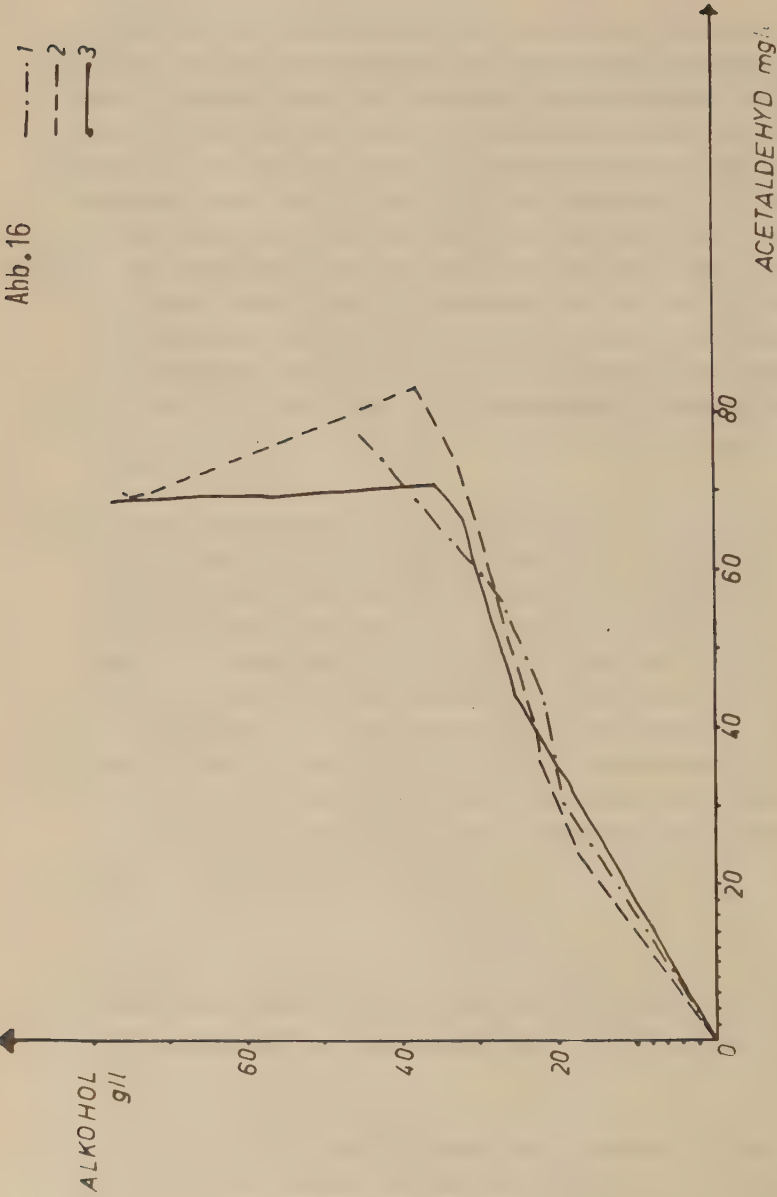


Abb. 16 Das Verhältnis von Alkohol : Acetaldehyd in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Substrates

1 = pH 2,75
2 = pH 3,5
3 = pH 4

Diskussion der Ergebnisse:

Die Gärung im vollsynthetischen, wuchsstofffreien Medium unterscheidet sich sehr stark von der Gärung in dem natürlichen Substrat Traubenmost. Generell fällt auf, daß die Gärung trotz wesentlich höherer Temperatur im synthetischen Medium gezügelter und gleichmäßiger erscheint. Im natürlichen biologischen Substrat steigen die Gehalte an Acetaldehyd, Pyruvat, Acetat und Äthanol sehr schnell an. Acetaldehyd und Pyruvat, die Stoffwechselzwischenprodukte fallen anschließend ab, während die Stoffwechselendprodukte Äthanol und Acetat langsam weiter ansteigen. Im synthetischen Medium steigt der Acetaldehydgehalt so langsam an, daß er erst nach 3 Wochen sein Maximum erreicht. Pyruvat dagegen hat bereits nach 5 Tagen einen Maximalwert. Die Alkoholbildung geht gleichmäßig vonstatten.

Das Bild dieser Gärung, vor allem der hohe Pyruvatgehalt, deutet auf eine Hemmung im Bereich des Pyruvatabbaus hin, eine Beobachtung, die von DITTRICH bestätigt wird (23). Thiamingaben führten nach seinen Angaben zu einer Nivellierung der aufeinanderfolgenden Metaboliten, was ein Beweis dafür ist, daß die Synthese des Coenzym TPP für die Synthese der Brenztraubensäuredecarboxylase geschwindigkeitbestimmend ist und daß die benutzte Hefe nicht in der Lage ist, die von ihr verwertbare Thiaminmenge in der entsprechenden Zeit selbst zu synthetisieren. Da relativ wenig Pyruvat zu Acetaldehyd abgebaut wird, nimmt dieser auch nur langsam zu und zwar in demselben Verhältnis wie Äthanol. Die langsame Gärung garantiert einen relativ gleichbleibenden NADH-Spiegel, der Verhältnisse, wie sie von HOLZER (40) beschrieben wurden, über 3 Wochen aufrecht erhält.

Der pH-Wert der einzelnen Proben hat auf den generellen Kurvenverlauf keinen Einfluß. Allerdings unterscheiden sich die absoluten Gehalte der Stoffwechselprodukte bei verschiedenen pH-Werten erheblich voneinander. Es fällt wieder auf, daß die Probe mit pH 4 am besten gärt, während der pH von 2,75 eindeutig als hemmend bezeichnet werden kann. Nach 30 Tagen hat

diese Probe auch den höchsten Acetaldehydgehalt, da sie erst nach dieser Zeit ihr Maximum erreicht. Der niedrige Pyruvatgehalt in Probe 1 deutet wieder eindeutig auf die schon in den ersten Stadien gehemmte Glykolyse hin. Ein pH-Wert von 4 scheint wohl optimal für die Gärung zu sein. Ein pH-Wert von 2,75 scheint für die benutzte Hefe unphysiologisch zu sein und kann zu erhöhten Acetaldehydwerten führen, da die Gärung nur schleppend verläuft.

Insgesamt zeigen die Versuche, daß der Acetaldehydgehalt im Laufe der abklingenden Gärung und Lagerung abnehmen kann. Der Beginn der Abnahme ist individuell nach Gärsubstrat verschieden, sodaß es zweckmäßig erscheint, den Stillstand des Acetaldehydabbaus festzustellen.

Für die Praxis zeigen die Versuche, daß der Zeitpunkt des Abstiches von Weinen so gewählt werden sollte, daß man mit einer weiteren Abnahme von Acetaldehyd nicht mehr rechnen kann. Erfolgt der mit einer Schwefelung verbundene Abstich eines nicht durchgegorenen Weines zu früh, so enthält das Produkt nicht weitgehend abgebauten Acetaldehyd und benötigt damit erhebliche Mengen an SO_2 . Kommt es infolge des verfrühten Abstiches erneut zur Gärung, so bindet die zugesetzte SO_2 den gebildeten Acetaldehyd, und es kommt zu einem extrem hohen SO_2 -Bedarf des Weines.

3.3. Einfluß der Substratvitaminierung auf die Acetaldehydbildung

Die Versuche mit Modellösungen hatten gezeigt, daß die Gärung in diesen Nährlösungen völlig anders verlief als im natürlichen Substrat. Es müssen also im Traubenmost Stoffe vorhanden sein, die den Gärverlauf in erheblichem Umfang beeinflussen können. Aus diesem Grunde wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der den künstlichen Substraten Vitamine zugesetzt wurden.

Zum Plasma und Zellwachstum sowie zur Gärung benötigt die Hefe Vitamine. Es gibt Hefen, welche die nötigen Vitamine selbst synthetisieren; man nennt sie auxo-autotroph. Diejenigen Hefen, die einzelne Vitamine nicht mehr selbst zu synthetisieren vermögen und bei der Vermehrung auf die Anwesenheit dieser Stoffe im Substrat angewiesen sind, nennt man auxo-heterotroph (94). Die Heterotrophie kann sich auf einen einzigen Wuchsstoff oder mehrere erstrecken.

Für das Wachstum der Hefen kommen vor allem folgende Hefewuchsstoffe und Vitamine in Betracht: Inosit, Biotin, Pantothensäure und ihr Baustein β -Alanin, Thiamin und seine Vorstufen Pyrimidin und Thiazol, Pyridoxin, Nikotinsäure und in einigen Fällen Paraaminobenzoessäure (86). Die spezielle physiologische Bedeutung der einzelnen Wachstumsfaktoren liegt offensichtlich in ihrer Aufgabe, stoffwechselfunktionelle Bauglieder wichtiger Zellfermente zu sein.

Thiamin:

Thiamin wirkt als Coenzym der Hefedecarboxylase (58) speziell bei der Decarboxylierung der Brenztraubensäure.

Nikotinsäure:

Nikotinsäure ist in der Form des Nikotinsäureamids ein Bestandteil des Hefe-Coenzym NAD, das als Wasserstoffüberträger im Phosphoglycerinaldehyd-Acetaldehyd-Dehydrogenase-System sowie bei anderen Dehydrierungen eine wichtige Funktion ausübt.

Pantothensäure:

Pantothensäure ist ein Bestandteil des Coenzym A (68), das wichtige Acetylierungsreaktionen steuert und dadurch eine Schlüsselstellung im Kohlenhydratfettsäurestoffwechsel einnimmt.

Biotin:

Der Hauptweg von Pyruvat zum Oxalacetat besteht in der direkten Anlagerung von aktivierter Kohlensäure durch ein biotinhaltiges Enzym (47).

Pyridoxin:

Pyridoxin ist wirksam in der Form des Pyridoxalphosphates, als Coferment von Aminosäure-Decarboxylasen, Transaminasen und vermutlich auch von Desaminasen. Es besitzt große Bedeutung für den intermediären N-Stoffwechsel (47).

Paraaminobenzoessäure:

Von Paraaminobenzoessäure wird angenommen, daß sie an der Bildung von Polypeptidketten maßgeblich beteiligt ist (84).

Meso-Inosit:

Meso-Inosit wird meist bei den B-Vitaminen aufgeführt, obwohl sie lediglich ein essentielles Kohlenhydrat bzw. zyklischen Alkohol darstellt. Die meisten Hefen vermögen meso-Inosit selbst zu synthetisieren. In den Zellen soll meso-Inosit lipoidgebunden und in lecithinähnlichen Verbindungen vorkommen (94).

Unmittelbar als Gärungsfaktoren wirken nur Thiamin und Nikotinsäure, während Biotin, Pantothensäure und Pyridoxin nur indirekt über die Förderung der Vermehrung auf die Gärung einwirken. Nach einer Tabelle von BURKHOLDER u. Mitarbeiter (9) ist die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* in Bezug auf Biotin, Pantothensäure, Inosit und Thiamin auxo-heterotroph.

Wie die geschilderten Versuche gezeigt hatten, ist die Menge der gebildeten Acetaldehyds vom Gärverlauf abhängig. Wenn nun Wachstumsstoffe Wachstum und Gärung beeinflussen, so liegt der Schluß nahe, daß sie auch die Menge des gebildeten Acetaldehyds beeinflussen können. Um diese Frage zu klären, wurde eine weitere Versuchsreihe angesetzt, bei der der synthetischen Nährlösung verschiedene Vitaminmengen zugesetzt wurden. Die Mengen von je 1,5 l wurden auf den pH-Wert 4 eingestellt. Vor dem Autoklavieren erhielt jeweils ein Ansatz 3 ml einer Vitaminlösung, die pro ml folgende Vitaminmengen enthielt:

2,5	mg Vit. B ₁ -nitrat
1	mg Vit. B ₂
10	mg Nicotinsäureamid

1	mg Vit. B ₆ -hydrochlorid
1,5	mg Ca-D-pantothenat
0,025	mg Biotin
0,002	mg Cyanocobalamin

Die Lösung war aus Roche BV[®] Vitamindragees hergestellt worden.

Ergebnisse:

Die wichtigsten Einzelwerte dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6

Äthanol-, Acetaldehyd- und Pyruvatbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Vitaminierung des Substrates

Außerdem sind die in der Tabelle zusammengefaßten Ergebnisse auch graphisch ausgewertet worden. Auf die Abbildungen wird bei der Besprechung der einzelnen Metaboliten verwiesen.

Unterschiede in der Äthanolentwicklung bei der Gärung in einem vitaminfreien mit einem vitaminisierten Substrat sind in Abbildung 17 dargestellt.

Abbildung 17

Alkoholbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Vitaminierung des Substrates

Die Abbildung zeigt, daß die vitaminisierte Probe nach 13 Tagen durchgegoren ist, während die vitaminfreie Probe nach 30 Tagen immer noch gärt. Die Vitamine im Gärsubstrat bewirken einen sehr steilen Äthanolanstieg vom 1. bis zum 8. Tag, in dem mehr als 6/7 der gesamten Äthanolmenge gebildet werden. Der tägliche Zuwachs beträgt im Mittel knapp 8 g/l. In der vitaminfreien Probe hat sich nach dieser Zeit erst 1/4 der theoretisch möglichen Äthanolmenge gebildet. Die Zuwachsrate beträgt hier im Mittel 3 g/l und pro Tag. Nach 30 Tagen allerdings ist der Äthanolgehalt der vitaminfreien Probe um 10 g/l höher als der der vitaminisierten Probe.

T a b e l l e 6

Äthanol-, Acetaldehyd- und Pyruvatbildung im Verlauf der Gärung
in Abhängigkeit von der Vitaminierung des Substrates

Tage	Äthanol g/l		Acetaldehyd mg/l		Pyruvat mg/l	
	Probe-Nr.		Probe-Nr.		Probe-Nr.	
	1	2	1	2	1	2
	Vitaminzusatz		Vitaminzusatz		Vitaminzusatz	
	-	+	-	+	-	+
1	2,1	4,3	9,5	34,5	30,9	13,3
1 1/2	-	-	11,5	64	-	-
2	9,6	22,7	18	73	84	30,9
2 1/2	-	-	25,5	67	-	-
3	12,8	33,5	19	69	137,0	35,4
4	-	-	22	54	-	-
5	-	-	25,5	43	-	-
6	17,7	55,0	29	38	234,3	26,5
7	-	-	29	33	-	-
8	22,1	61,2	39	34	225,4	22,1
10	25,5	-	44	30	225,4	13,3
13	32,9	68,2	67	30	225,4	8,8
16	38,2	-	71	29	207,7	8,8
21	-	-	78	29	190,1	4,4
30	74	69,8	69,5	29	141,4	4,4
49	-	-	64	32	-	-
64	-	-	62	28	-	-

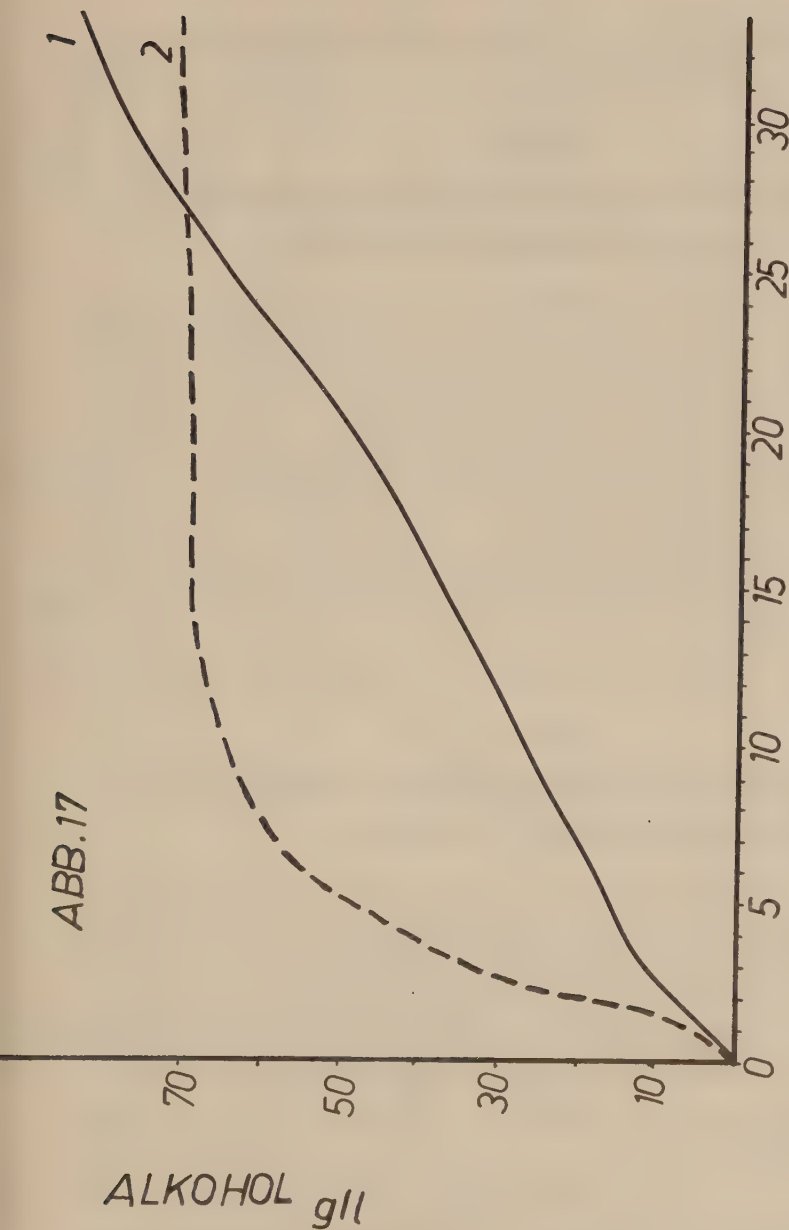


Abb. 17 Alkoholbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Vitaminierung des Substrates

- 1 = vitaminfrei pH 4
- 2 = vitaminisiert pH 4

Die Acetaldehydbildung der Proben im Verlauf der Gärung ist in Abbildung 18 dargestellt.

Abbildung 18

Acetaldehydbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit
von der Vitaminierung des Substrates

Wie erwartet, hat die vitaminisierte Probe, die sich durch große Gärintensität ausgezeichnet hat, ein Maximum in der Acetaldehydentwicklung zu Beginn der Gärung, das sehr jäh abfällt. Vom 16. Tag an verändert sich der Acetaldehydgehalt nicht mehr. Trotz des scharfen Maximums übersteigt der Gehalt an Acetaldehyd nicht die bei biologischen Substraten gewohnten Werte. Der Endwert liegt bei 28 mg/l. Entsprechend der geringen Gärintensität steigt der Acetaldehydgehalt in der vitaminfreien Probe nur langsam und fällt danach nur ganz gering ab. Das Maximum liegt am 21. Tag bei 77,5 mg/l und der Wert nach 30 Tagen beträgt 69 mg/l

Abbildung 19 gibt die Pyruvatgehalte im Verlauf der Gärung wieder.

Abbildung 19

Pyruvatbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von
der Vitaminierung des Substrates

Entsprechend den geäußerten Beobachtungen und Vermutungen von DITTRICH (23) ist der Pyruvatgehalt der vitaminisierten Probe im gesamten Gärverlauf sehr niedrig. Das Maximum wird am 3. Tag erreicht und liegt bei 38 mg/l. Danach fällt der Gehalt langsam auf 5 mg/l ab und bleibt konstant. Die vitaminfreie Probe dagegen verhält sich entsprechend den früher gemachten Beobachtungen.

In Abbildung 20 ist das Verhältnis von Alkohol zu Acetaldehyd dargestellt.

Abbildung 20

Das Verhältnis von Alkohol zu Acetaldehyd in Abhängigkeit
von der Vitaminierung des Substrates

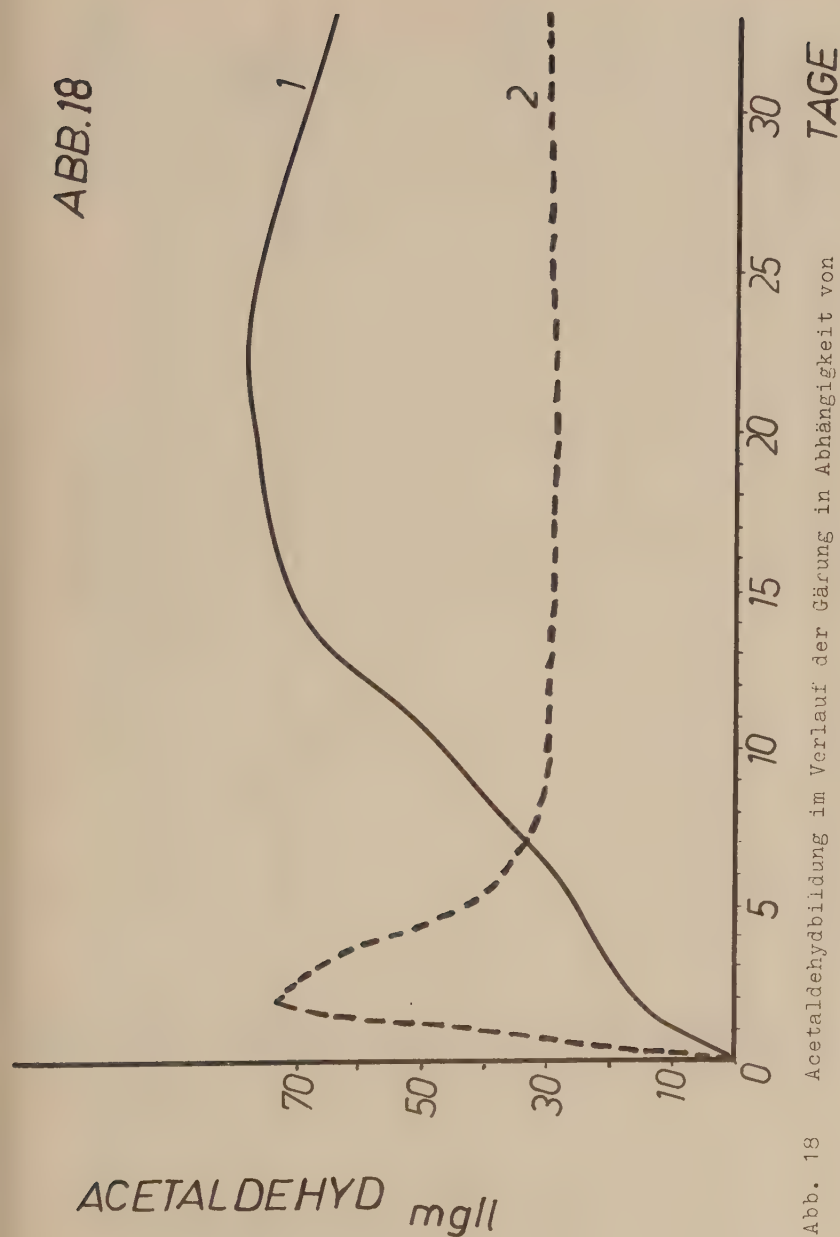


Abb. 18 Acetaldehydbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Vitaminierung des Substrates

Abb. 19

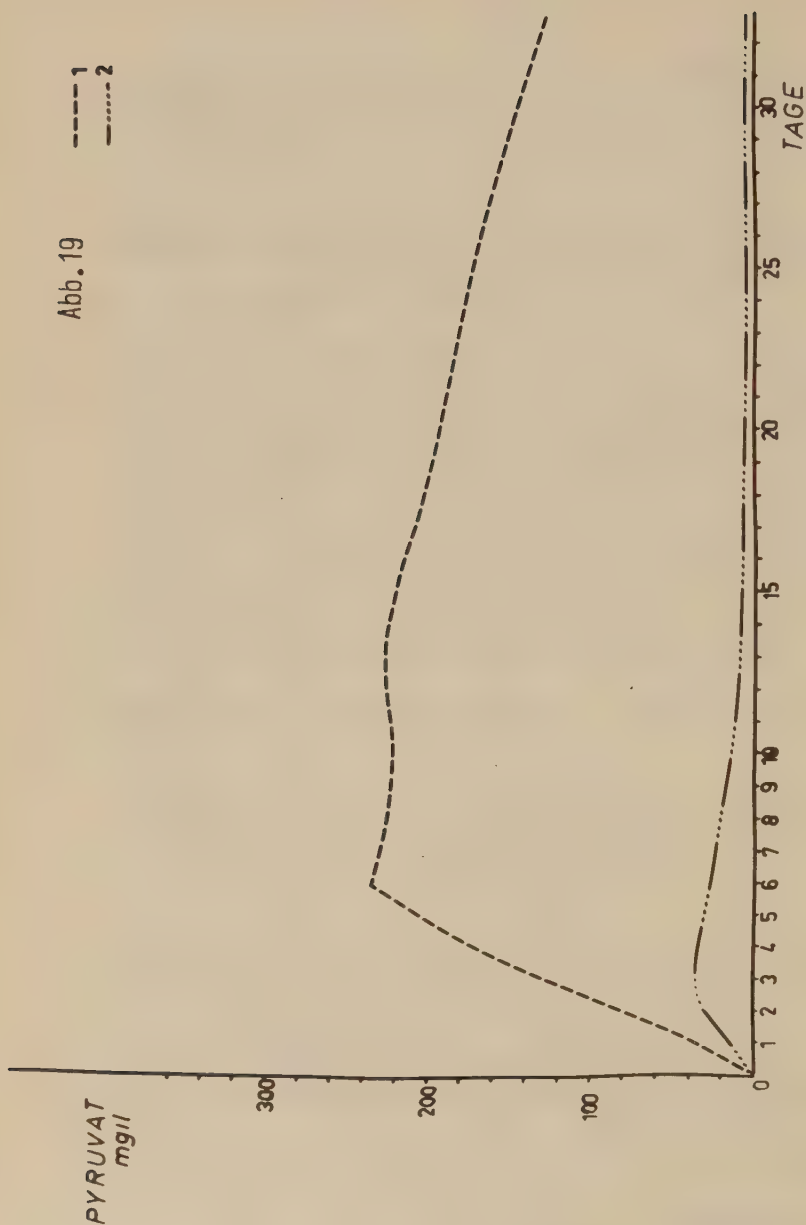


Abb. 19 Pyruvatbildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Vitaminisierung des Substrates

1 = vitaminfrei
2 = vitaminisiert

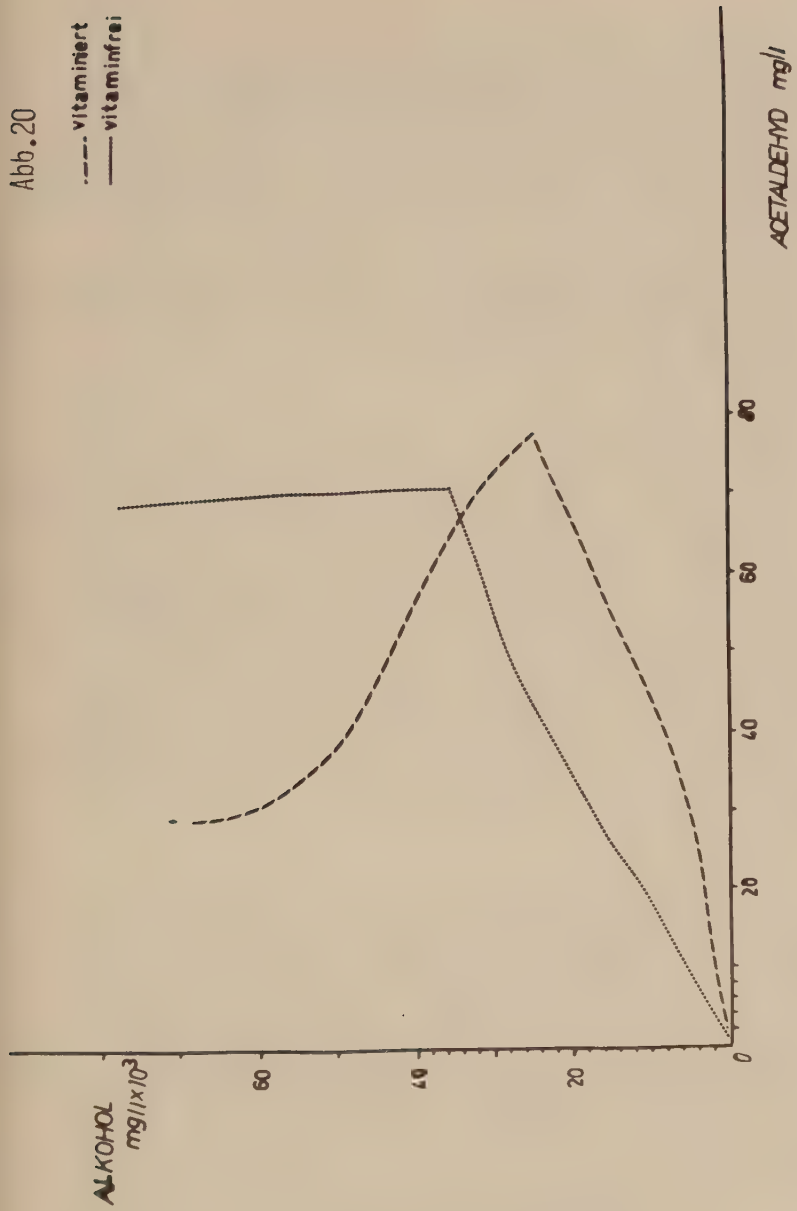


Abb. 20 Das Verhältnis von Alkohol : Acetaldehyd in Abhängigkeit von der Vitaminierung des Mediums

In der vitaminfreien Probe steht bis zu einem Gehalt von 36 g/l Alkohol eine zu geringe NADH-Menge zum Acetaldehydabbau zur Verfügung. Demnach scheint der NADH-Spiegel gerade so groß zu sein, daß er den Acetaldehydgehalt für den Rest der Gärung konstant hält. Die vitaminisierte Probe hat anfangs im Gegensatz zu der beschriebenen einen größeren NADH-Verbrauch und der Acetaldehyd steigt sehr schnell an. In der Übergangs- und in der anaeroben Phase wird andererseits aber NADH im Überschuß frei. Der Acetaldehydgehalt fällt daher bis zum Erreichen eines Äthanolgehaltes von 55 g/l genauso schnell wie er vorher gestiegen ist.

Diskussion der Ergebnisse:

Aufgrund der Eingriffe in den Eiweiß- und Kohlenhydratstoffwechsel scheinen die Wachstumsstoffe sowohl Vermehrung der Hefen als auch deren Gärung stark zu aktivieren. Der beste Beweis dafür ist die rasch einsetzende und auch rapid verlaufende Gärung. Die Hefe muß in diesem Substrat eine ungemein große Vermehrungs- und Atmungsrate haben und verbraucht sehr schnell den vorhandenen Sauerstoff. Vermehrungs- und Atmungsprozesse sind aber in großem Maße NADH verbrauchende Reaktionen. Es kommt in Bezug auf dieses Coenzym zu einer Verarmung im Cytoplasma, während der Gehalt an Pyruvat-decarboxylase gleichzeitig recht hoch ist. Ein klarer Beweis dafür ist die relativ niedrige Pyruvatkonzentration bei maximaler Acetaldehydkonzentration.

Auch daß die Äthanolkonzentration der vitaminfreien Probe nach 30 Tagen die der vitaminisierten Probe übersteigt, läßt sich dadurch erklären. Die vitaminisierte Probe hatte, bedingt durch die hohe Vermehrungs- und Atmungsrate einen hohen Glucoseverlust. Die vitaminfreie Probe atmete langsam und hatte eine entsprechend niedrige Vermehrungsrate, die die höhere Äthanolausbeute nach wesentlich längerer Gärzeit bedingt. In Abbildung 21 sind die Verhältnisse in Bezug auf Acetaldehyd und Alkoholbildung pro Tag graphisch dargestellt.

Abbildung 21

Acetaldehydbildung im Verlauf der Gärung im Vergleich zur
Alkoholbildung pro Tag und in Abhängigkeit von dem Gehalt an
Vitaminen im Substrat

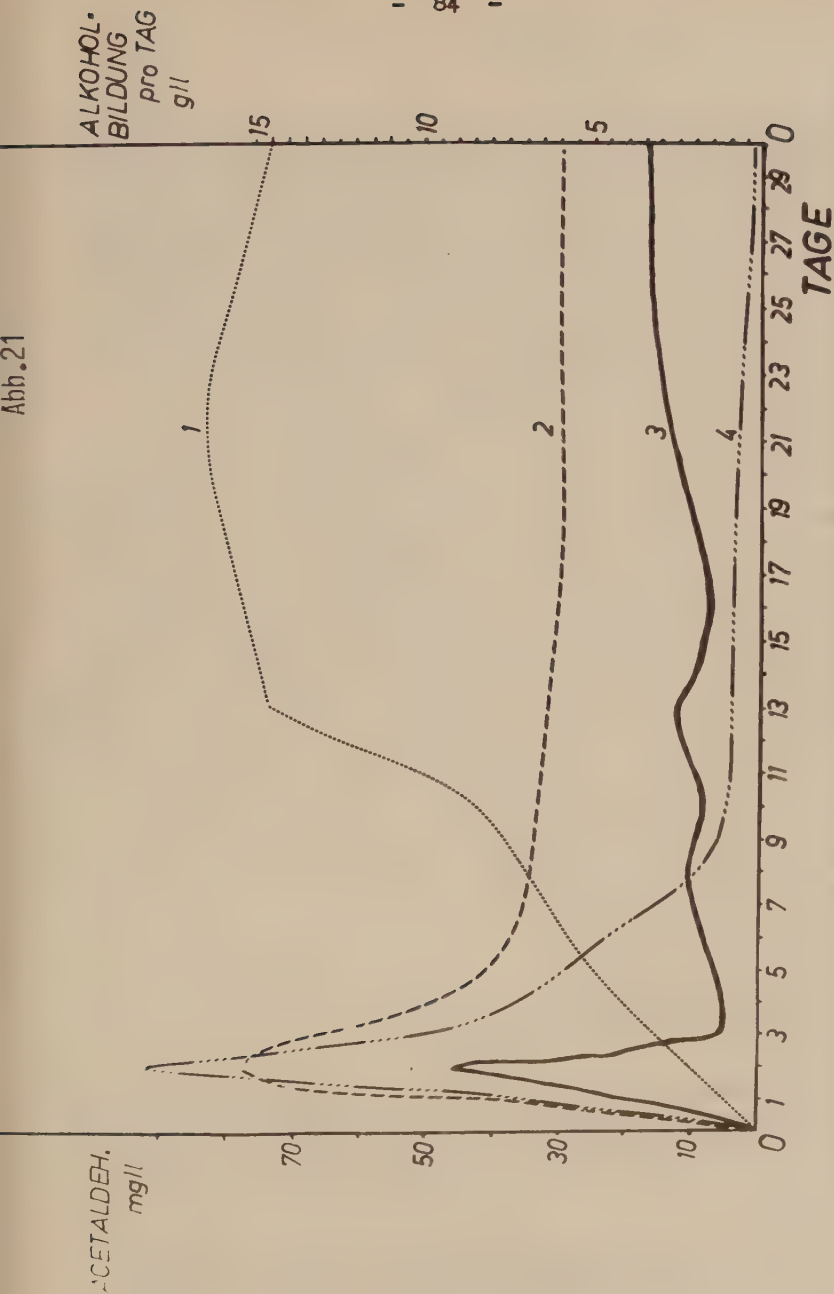


Abb. 21

Acetaldehydbildung im Verlauf der Gärung im Vergleich zur Alkoholbildung pro Tag und in Abhängigkeit vom Gehalt an Vitaminen im Substrat

- 1 = Acetaldehydbildung im vitaminfreien Substrat
- 2 = Acetaldehydbildung im vitaminisierten Substrat
- 3 = Alkoholbildung im vitaminfreien Substrat
- 4 = Alkoholbildung im vitaminisierten Substrat

Die vitaminisierte Probe zeigt die typische, am Anfang der Gärung auftretende Acetaldehydakkumulation, die nach 5 Tagen stark abfällt. Die Alkoholbildung verhält sich proportional zum Gehalt an Acetaldehyd. In der vitaminfreien Probe sind die Verhältnisse nicht ganz so klar. Die Alkoholbildung ist zu Beginn der Gärung trotz der eindeutigen Gärhemmung relativ gut, fällt aber am dritten Tag stark ab und nimmt von da an, anfangs oszillierend, ständig zu. Der Peak am zweiten Tag ist wahrscheinlich auf die am Anfang mobilisierten Reserven der Hefe zurückzuführen. Der Acetaldehydgehalt in dieser Probe steigt von Anfang nur langsam und erreicht erst nach 21 Tagen das Maximum. Ein Peak, entsprechend der anfänglichen Alkoholbildung, tritt hier nicht auf. Abgesehen von den Vorgängen in den ersten drei Tagen kann man auch am Gärverlauf der vitaminfreien Probe sehen, daß sich die Kurven in ihrem Verlauf entsprechend verhalten. Unter sonst gleichen Gärbedingungen müßte sich der Acetaldehyd proportional zum Alkoholgehalt der Probe verhalten. Diese Hypothese wird durch Acetaldehydbestimmungen im Bier bestätigt (61). Im Starkbier wurde ein Gehalt von 17 mg/l im Mittel festgestellt, während in Lager- und Exportbieren durchschnittlich 8 mg/l gemessen wurden. Da Bier vom Substrat und den Gärbedingungen her ein ziemlich konstantes Produkt ist, können die verschiedenen hohen Acetaldehydgehalte auf den Differenzen im Alkoholgehalt beruhen.

3.3.1. Einfluß der Vitaminierung in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration

Der vorangegangene Versuch hat deutlich gezeigt, daß die Vitaminierung einen enormen Einfluß sowohl auf die Gärintensität als auch auf die Menge der im Verlauf der Gärung gebildeten Stoffwechselprodukte hat.

Es ist nun von Interesse, die Wirkung der Wasserstoffionenkonzentration unter so veränderten Gärbedingungen zu prüfen.

Abb. 26

— 1
 ▨ 2-4 u. 6-9
 - - - 5

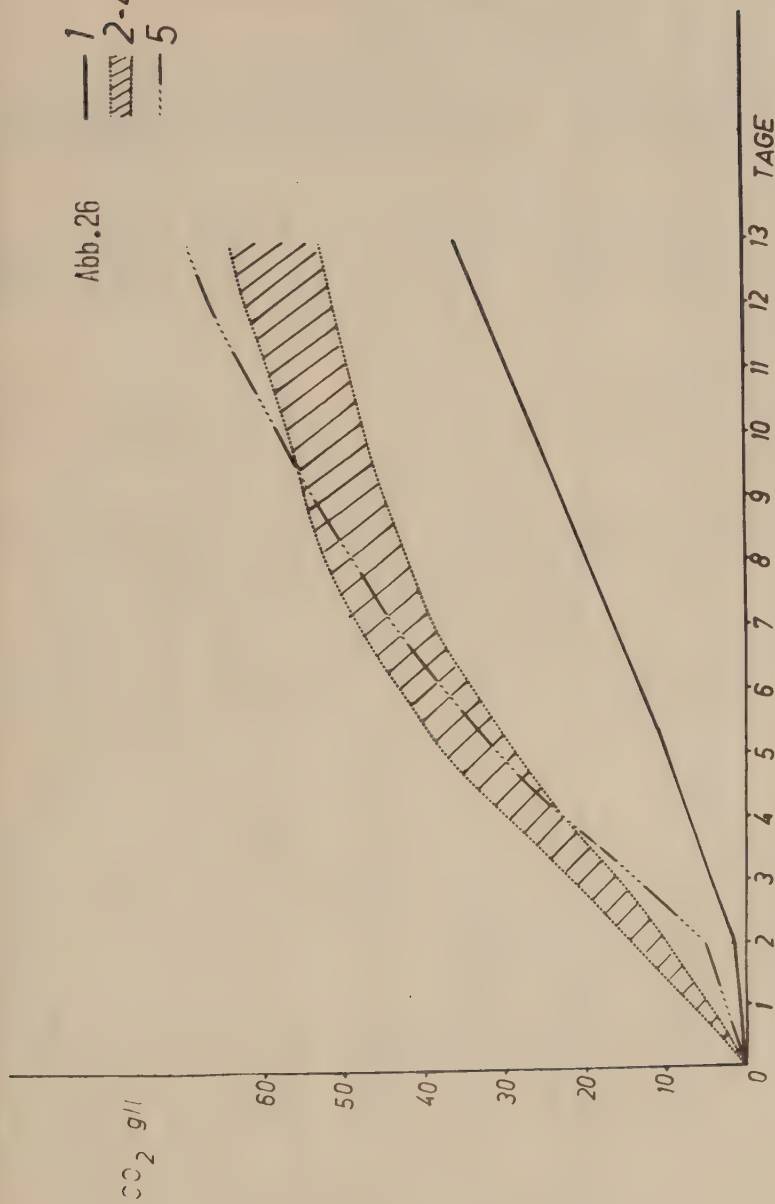


Abb. 26 CO₂-Bildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Vitaminierung des Substrates

1 = vitaminfrei

2-4 u. 6-9 = Mangel an Biotin, Pantothenat, Inosit, Pyridoxin = Hydrochlorid, Nikotinsäure und p-Aminobenzolsäure, und voll vitaminisiert

5 = Mangel an Thiamin = Hydrochlorid

Tabelle 7

Äthanol-, Acetaldehyd- und Pyruvatbildung im Verlauf der Gärung
in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration im
vitaminierten Substrat

Tage	Äthanol g/l			Acetaldehyd mg/l			Pyruvat mg/l		
	Probe-Nr.			Probe-Nr.			Probe-Nr.		
	1 pH 2,75	2 pH 3,5	3 pH 4,0	1 pH 2,75	2 pH 3,5	3 pH 4,0	1 pH 2,75	2 pH 3,5	3 pH 4,0
1	4,3	5,8	4,3	26	33	34,5	8,8	13,3	13,3
1 1/2	-	-	-	37	75	64	-	-	-
2	19,4	24,4	22,7	52	77	73	11,1	35,4	30,9
2 1/2	-	-	-	53	72	67	-	-	-
3	21,6	33,5	33,5	51,5	69	69	35,4	35,4	35,4
4	-	-	-	51,5	50,5	54	-	-	-
5	-	-	-	51,5	39	43	-	-	-
6	43,5	51,3	55,0	49	36	38	26,5	22,1	26,5
7	-	-	-	46	32	33	-	-	-
8	52,0	56,2	61,2	48	36	34	26,5	17,7	22,1
10	55,6	58,3	-	41	32	30	26,5	13,3	13,3
13	-	61,2	68,2	37	32	30	26,5	8,3	8,3
16	64,4	-	-	30	30	29	17,7	8,3	8,3
21	-	-	-	26	30,5	29	13,3	0	4,4
30	72	66,7	69,8	26,5	32	29	13,3	4,4	4,4
49	-	-	-	28	34	32	-	-	-
64	-	-	-	28	27	28	-	-	-

Abb. 22

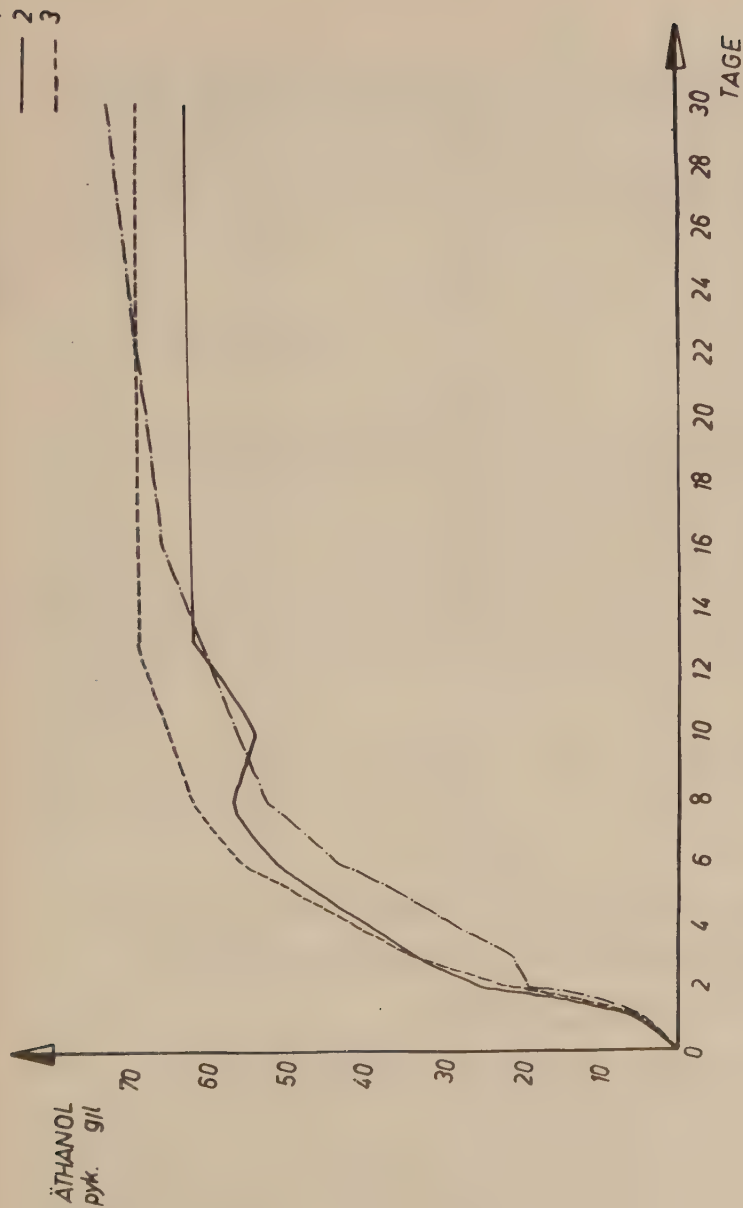


Abb. 22 Athanolbildung in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration im vitaminisierten Substrat.

1) = pH 2,75, 2) = pH 3,5, 3) = pH 4

1
2
3

Abb. 23

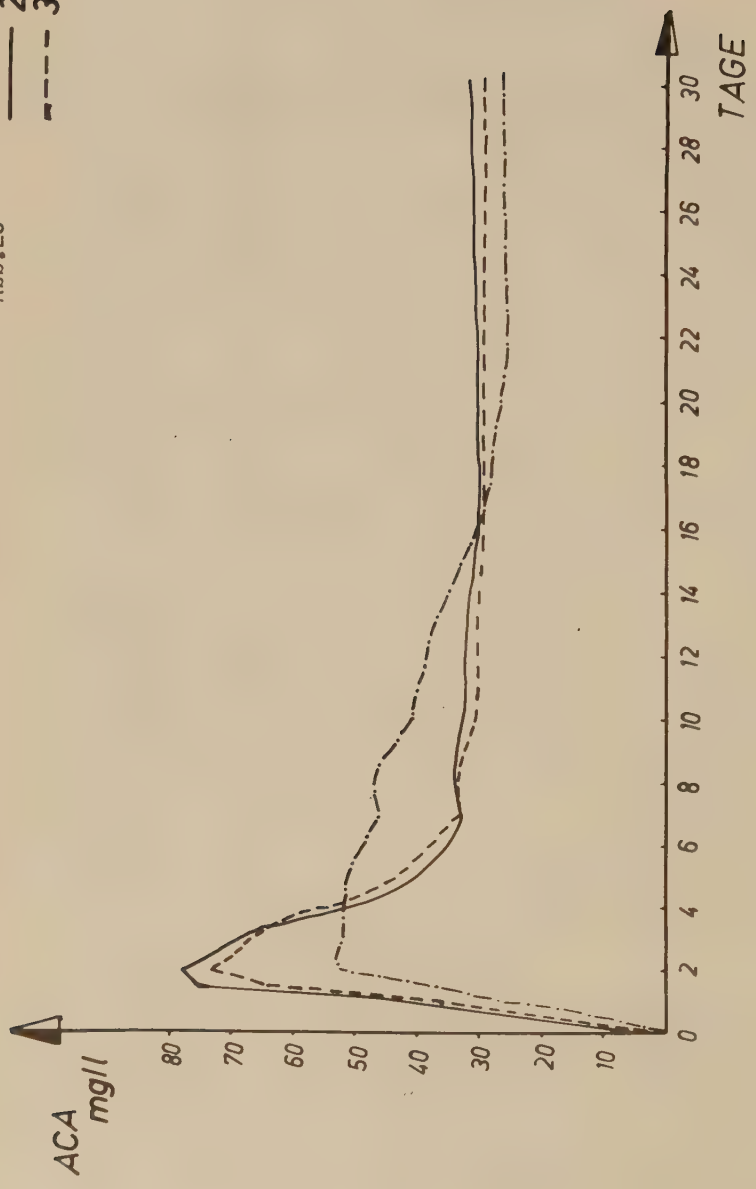


Abb. 23 Acetaldehydbildung in Abhängigkeit von der wasserstoffionenkonzentration im vitaminisierten Substrat

1 = pH 2,75
2 = pH 3,5
3 = pH 4

Probe Nr. 2 hat den höchsten Acetaldehydgehalt, dicht daneben liegt Probe Nr. 3. Einen generell flacheren Verlauf als diese Kurven zeigt die Probe Nr. 1. Der nach 30 Tagen gemessene Acetaldehydgehalt der 3 Proben zeigt eine große Annäherung; die Proben unterscheiden sich jeweils nur durch 3 mg/l voneinander.

In Abbildung 24 ist der Pyruvatgehalt der 3 Proben im Verlauf der Gärung dargestellt.

Abbildung 24

Pyruvatbildung in Abhängigkeit von der Wasserstoffionen- konzentration im vitaminisierten Substrat

Alle 3 Proben haben anfangs ein kleines Maximum. Danach fällt der Gehalt an Pyruvat langsam ab. Nur die Probe mit der relativ hohen Wasserstoffionenkonzentration (pH 2,75) bleibt fast auf dem erreichten Niveau. Die absoluten Gehalte sind aber bei den 3 Proben im Gegensatz zur Gärung im vitaminfreien Substrat sehr niedrig.

Abbildung 25 ist eine graphische Darstellung der Zahlen für das Acetaldehyd-Alkohol-Verhältnis.

Abbildung 25

Das Verhältnis von Äthanol zu Acetaldehyd in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration im vitaminisierten Substrat

Interessant ist der Verlauf der Kurve für Probe Nr. 1. Sie ähnelt sehr stark den Kurven für vitaminfreie Gäransätze. Der einzige Unterschied besteht darin, daß der Acetaldehydgehalt zunächst aber nicht so hoch ansteigt wie in diesen Proben und am Ende der Gärung aber schließlich doch stark abfällt. Die hohe Wasserstoffionenkonzentration führt ebenso wie ein Wachstumsstoffmangel zu gehemmten Gärungen, die ihren Niederschlag in einem

Abb. 24

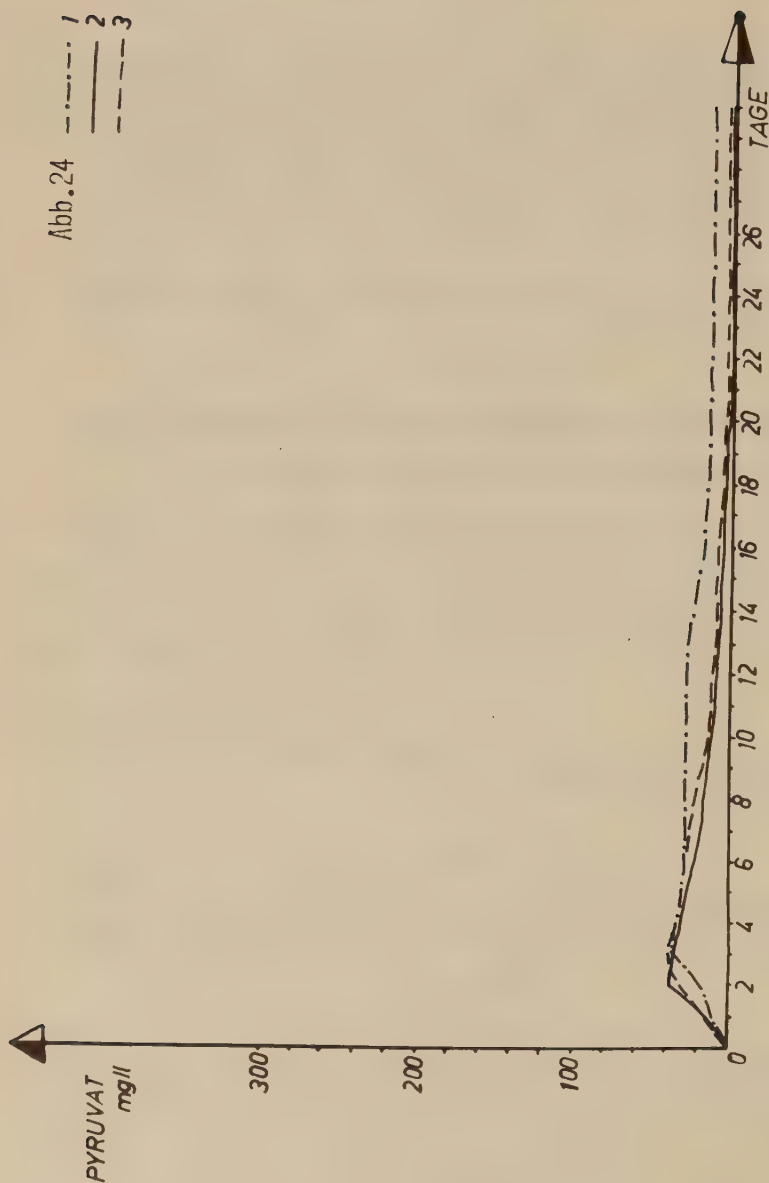


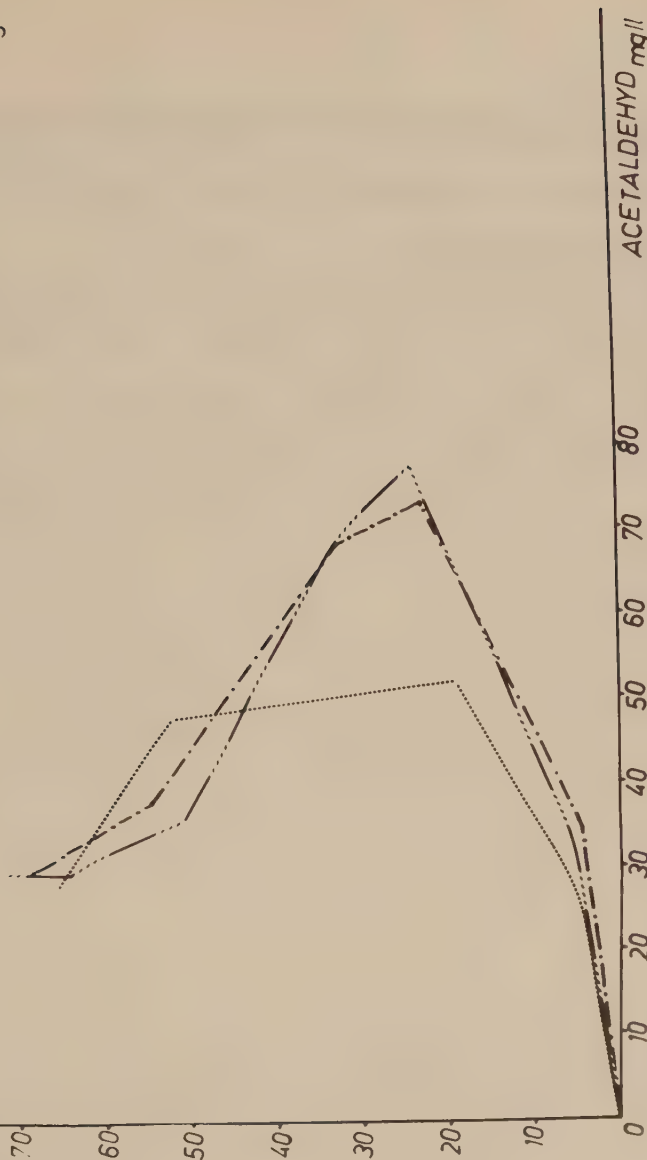
Abb. 24 Pyruvatbildung in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration
im vitaminisierten Substrat

1 = pH 2,75
2 = pH 4
3 = pH 4

ÄTHERALHOL
g/l

Abb. 25

..... 1
— 2
- - - 3



ACETALDEHYD mg/l

Abb. 25 Das Verhältnis von Äthanol zu Acetaldehyd in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration im vitaminisierten Medium.

1 = pH 2,75
2 = pH 3,5
3 = pH 4

bestimmten, und zwar dem graphisch dargestellten Verhältnis von NAD : NADH findet. Die Proben mit dem höheren pH-Wert zeigen einen steilen Anstieg und einen ebenso steilen Abfall.

Diskussion der Ergebnisse:

Beim Vergleich der Kurven, die sich aufgrund der Untersuchungen im vitaminisierten Substrat ergeben, mit denen, die sich aufgrund der Untersuchungen im vitaminfreien Substrat ergeben, fällt auf, daß erstere eine wesentlich schneller ablaufende Gärung widerspiegeln. Vergleicht man die Proben untereinander, dann gären wiederum die mit niedriger Wasserstoffionenkonzentration besser als die mit hoher. Der Unterschied der einzelnen Proben untereinander ist aber im vitaminisierten Substrat nicht so groß wie im vitaminfreien. Vor allem die Gärintensität der Probe mit pH 2,75 bleibt in diesem Medium nicht so wesentlich hinter den übrigen zurück wie im vitaminfreien. Ähnliche Beobachtungen macht man in Bezug auf Pyruvat. Der Verlauf der Acetaldehydkurve erklärt sich wieder durch die Gärintensität in den verschiedenen Stadien. Die anfangs langsame Gärung wird später zügig und drückt dadurch den Acetaldehydgehalt auf ein im Vergleich zu den übrigen Proben niedriges Niveau. Ein wuchsstofffreies Medium bewirkt, daß die Hefe in Bezug auf pH-Schwankungen - besonders Senkungen - sehr viel weniger reagiert als im vitaminarmen Substrat.

3.3.2. Einfluß einzelner Vitamine bei konstantem pH-Wert

Die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche zeigen deutlich, daß vitaminisierte Substrate wesentlich besser gären als vitaminfreie. Auch im Hinblick auf einen niedrigen Pyruvat- und Acetaldehydgehalt schneiden die vitaminisierten Proben wesentlich besser ab als die vitaminfreien. Da die Versuche aber nur mit Multivitaminlösungen durchgeführt worden waren, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob ein einzelnes Vitamin für den Acetaldehydabbau und die vermehrte Gärtätigkeit der Hefen verantwortlich ist oder mehrere in Kombination.

In den folgenden Versuchen soll die Abhängigkeit der Acetaldehyd- sowie Pyruvatbildung von den einzelnen Vitaminen geprüft werden.

Zunächst wurde wieder eine vollsynthetische Nährlösung hergestellt. Mit konzentrierter Phosphorsäure wurde die Lösung auf pH 3,6 eingestellt. Je 200 ml dieser Lösung wurden in 300 ml - Erlenmeyer gegeben und anschließend mit den entsprechenden Vitaminlösungen versetzt.

Als Vergleichslösungen dienten sowohl eine vollsynthetische, vitaminfreie Nährlösung als auch eine vollvitaminierte. Die vollvitaminierte Lösung enthielt folgende Vitamine in den von WILES (103) angegebenen Mengen, nämlich:

- 5 $\times$ Biotin
- 10 mg Inosit
- 1 mg Thiaminhydrochlorid
- 1 mg Pyridoxin-Hydrochlorid
- 2,5 mg Nikotinsäure
- 1 mg p-Aminobenzoessäure
- 2,5 mg Na-Pantothenat

Um den Einfluß einzelner Vitamine zu studieren, wurde in den folgenden Versuchen jeweils ein Vitamin weggelassen.

Das Schema zur Herstellung der Lösungen sah folgendermaßen aus:

- 1) Vollsynthetische Nährlösung, vitaminfrei = A
- 2) Vitaminlösung = B

Beim Ausmischen wurde nun so vorgegangen, daß zur Lösung A entweder alle Vitamine zugesetzt wurden (Probe A + B) oder jeweils eines der Vitamine weggelassen wurde (Probe Nr. 3 - 9). Schematisch sei die Zusammensetzung dieser Lösungen nochmals wiederholt.

Nr.	Lösungen
1	A
2	A und B
3	A und B - Biotin

Schema Fortsetzung:

Nr.	Lösungen
4	A und B - Inosit
5	A und B - Thiamin-Hydrochlorid
6	A und B - Pyridoxin-Hydrochlorid
7	A und B - Nikotinsäure
8	A und B - p-Aminobenzoesäure
9	A und B - Na-Pantothenat

Die neun Ansätze wurden sterilisiert, mit Hefen angeimpft und bei 26° C vergoren. Die Gärintensität wurde durch tägliches Wägen kontrolliert und in Abständen wurden Acetaldehyd-, Pyruvat-, Äthanol- und Acetatgehalt bestimmt. Der enzymatisch bestimmte Äthanolgehalt wurde am Ende der Gärung ebullioskopisch kontrolliert.

Ergebnisse:

Tabelle 8 enthält die gemessenen Einzelwerte.

Tabelle 8

Gärungszwischen- und Gärungsendprodukte in Abhängigkeit vom Mangel an einzelnen Vitaminen

Auf die graphische Darstellung, der in der Tabelle wiedergegebenen Werte, wird bei Besprechung der einzelnen Metaboliten verwiesen. Auf die graphische Wiedergabe der Äthanolbildung wurde verzichtet.

Wie die Abbildung 26 zeigt, gärt die vitaminfreie Probe wie bei all den anderen Versuchen eindeutig am schlechtesten.

Abbildung 26

CO₂-Bildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Vitaminierung des Substrates

T a b e l l e 8

Gärungszwischen- und Endprodukte in Abhängigkeit vom Mangel an einzelnen Vitaminen

Probe-Nr.	Mangel-Vitamin	Acetaldehyd mg/l nach 8 Tagen	14	21	Pyruvat mg/l 8	14	Acetat mg/l nach 14 Tagen	Alkohol Vol. % nach 21 Tagen
1	alle	42	43	53	243,1	234,2	330	4,9
2	—	27	28	28	26,5	26,5	440	6,64
3	Biotin	37	31	29	35,36	26,5	540	6,8
4	Inosit	29	29	30	22,1	17,68	440	6,95
5	Thiamin	38	35	42	243,1	225,4	406	7,3
6	Pyridoxin	30	30	30	26,5	17,68	484	6,7
7	Nikotinsäure	24	33	33	17,68	8,84	440	6,6
8	p-Aminobenzol-säure	28	28	30	30,94	13,26	412	6,8
9	Pantotherrat	52	41	41	35,36	26,5	468	7,15

Dazu wurden je 1,5 l Nährsubstrat auf die pH-Werte 2,75, 3,5 und 4 eingestellt und anschließend mit je 3 ml der vorher beschriebenen Vitaminlösung versetzt.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind im einzelnen der Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7

Äthanol-, Acetaldehyd- und Pyruvatbildung im Verlauf
der Gärung in Abhängigkeit von der Wasserstoffionen-
konzentration im vitaminisierten Substrat

Außerdem wurden die Ergebnisse in Abbildungen, auf die bei der Besprechung der einzelnen Metaboliten hingewiesen wird, graphisch dargestellt.

Aus Abbildung 22 ist die Äthanolbildung der 3 Proben zu ersehen.

Abbildung 22

Äthanolbildung in Abhängigkeit von der Wasserstoffionen-
konzentration im vitaminisierten Substrat

Die Graphik zeigt, daß die Probe, die auf den pH-Wert 4 eingestellt wurde, genauso wie im vitaminfreien Substrat am besten gärt. Mit kleinem Abstand folgt die Probe mit einem pH-Wert von 2,75. Vom 14. Tag an ist die Äthanolzunahme in dieser Probe aber größer als die in den Vergleichsproben, und es kommt zu Überschneidungen der Kurven. Nach 30 Tagen hat die Probe mit der höchsten Wasserstoffionenkonzentration den höchsten Äthanolgehalt mit 72 g/l gegenüber 68 und 63 g/l.

Der Gehalt an Acetaldehyd ist in Abbildung 23 aufgetragen.

Abbildung 23

Acetaldehydbildung in Abhängigkeit von der Wasserstoffionen-
konzentration im vitaminisierten Substrat

In dieser Probe war nach 12 Tagen etwa die Hälfte des Zuckers vergoren, während die anderen Proben fast oder ganz durchgegoren waren. Auffällig ist auch der Gärverlauf der Probe Nr. 5. Das Substrat enthielt kein Thiamin-Hydrochlorid. Anfangs geht die Gärung in diesem Fall sehr langsam vonstatten, gewinnt aber schon nach 2 Tagen an Intensität und hebt sich nach zehn Tagen absolut von den übrigen ab. Die Proben Nr. 2 - 4 und 6 - 9 zeigen einen sehr ähnlichen Gärverlauf und wurden deshalb zu einem Feld zusammengefaßt. Daraus geht deutlich hervor, daß der Mangel an einzelnen Vitaminen nicht zu einer direkten Gärhemmung führt.

Der Gehalt an Acetaldehyd ist in Abbildung 27 aufgetragen.

Abbildung 27

Acetaldehydgehalt der verschiedenen vitaminisierten
Proben nach 1 und 2 Wochen

Die Gehalte sind, um bei den vielen Proben eine größere Übersicht zu erreichen, in Säulenform dargestellt worden. Unter a ist jeweils der Acetaldehydgehalt nach einer Woche aufgetragen, während unter b der Gehalt nach zwei Wochen dargestellt ist. Aus der Gegenüberstellung der beiden Werte geht deutlich die Tendenz der Abnahme oder Zunahme hervor, während der Vergleich der Proben untereinander über die Wirkung einzelner Vitamine Aussagen macht.

Ein Gehalt von 50 mg/l Acetaldehyd wird nur von den Proben Nr. 1 und Nr. 9 überschritten; bei Nr. 1 in zunehmender Tendenz, bei Nr. 9 in abnehmender Tendenz.

Grundsätzlich kann man aber sagen, daß vollkommener Vitaminmangel des Substrates sowie Mangel an Pantothen säure zu einem erhöhten Acetaldehydgehalt führen. Die Tendenz, d. h. Zu- oder Abnahme korrespondieren jeweils mit der Gärintensität.

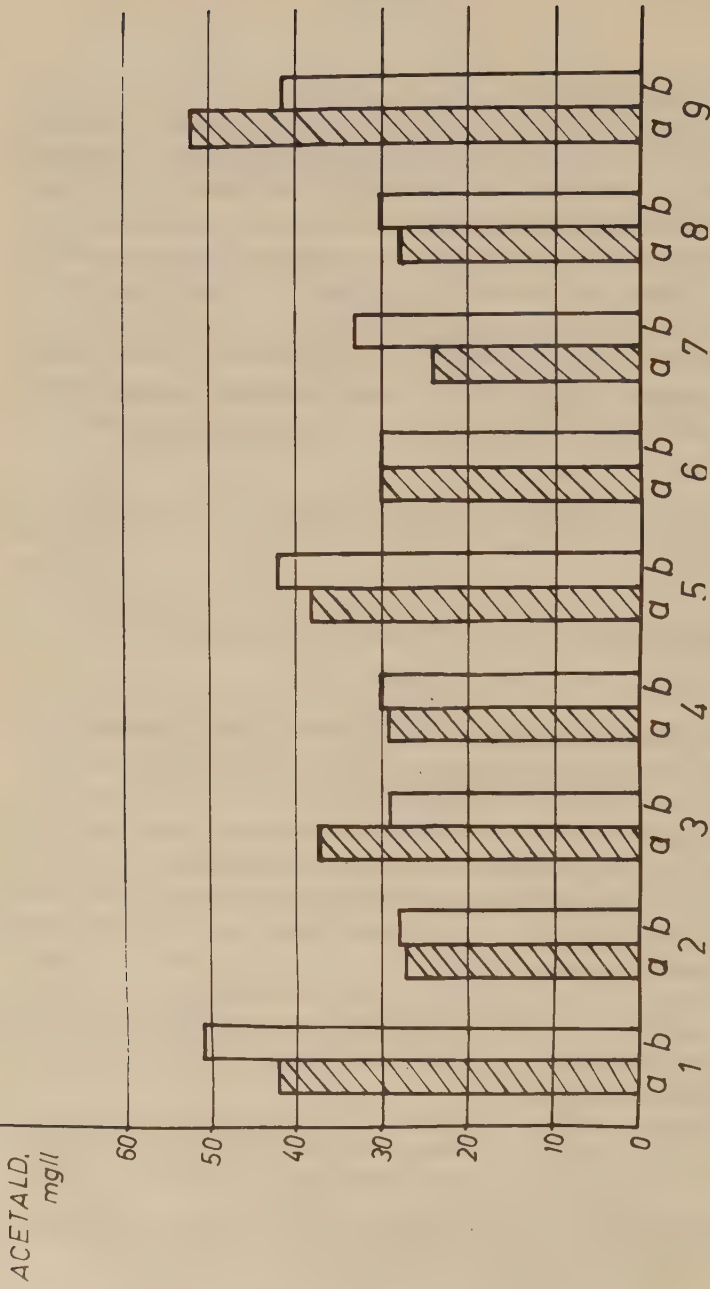


Abb. 27 Acetaldehydgehalt der verschiedenen vitaminisierten Proben nach 1 und 2 Wochen (a = nach 1 Woche und b = nach 2 Wochen)

- 1 = vitaminfrei
- 2 = voll-vitaminisiert
- 3 = Biotin-Mangel
- 4 = Inosit-Mangel
- 5 = Thiamin-Hydrochlorid-Mangel
- 6 = Pyridoxin-Hydrochlorid-Mangel
- 7 = Nikotinsäure-Mangel
- 8 = p-Aminobenzolsäure-Mangel
- 9 = Pantothenat-Mangel

Die 40 mg Marke wird außer von diesen Proben nur von der Thiamin-Hydrochlorid-Mangel-Probe überschritten. Biotin-Mangel scheint anfangs einen erhöhten Acetaldehydgehalt hervorzurufen, der aber auf das normale Niveau absinkt. Die niedrigsten Werte zeigt die voll-vitamierte Probe, Nr. 2. Die übrigen Proben bewegen sich bei einem durchschnittlichen Acetaldehydgehalt von 30 mg/l. Generell kann man sagen, daß Pantothenat- und in geringerem Maße Thiaminmangel zu einem erhöhten Acetaldehydgehalt führen.

Der Pyruvatgehalt nach acht und vierzehn Tagen ist in Abbildung 28 wiedergegeben.

Abbildung 28

Pyruvatgehalt der verschiedenen vitaminisierten
Proben nach 1 und 2 Wochen

Die Proben Nr. 1 und Nr. 5 heben sich ganz eindeutig von den übrigen ab. Das bestätigt die in den übrigen Versuchen geäußerte Vermutung, daß Thiamin-Mangel zu einem erhöhten Pyruvatgehalt führt. Die übrigen Proben unterscheiden sich nicht in bemerkenswerter Weise voneinander.

Der Äthanolgehalt übersteigt in zwei Proben 7 Vol. %. Bei Probe Nr. 9 ist es dadurch erklärlich, daß der Gärablauf in diesem Fall aufgrund des Pantothenat-Mangels in Richtung Äthanol gedrängt wurde. Bei Nr. 5, Thiamin-Mangel-Probe, dürfte eine Erklärung dieser Art nicht zum Ziel führen. Die übrigen Proben, außer Nr. 1, der vitaminfreien Probe, zeigen ähnliche Alkoholgehalte.

Acetat:

Wie man ebenfalls aus Tabelle 8 ersieht, nimmt Acetat mit zunehmender Alkoholbildung zu. Es scheint bei Inosit-Mangel erhöht zu sein, bewegt sich im großen und ganzen aber in den von der Gärung her bekannten Bereichen und scheint in keiner Beziehung zu den Acetaldehyd- und Pyruvatgehalten zu stehen.

PYRUVAT
mg/l

Abb. 28

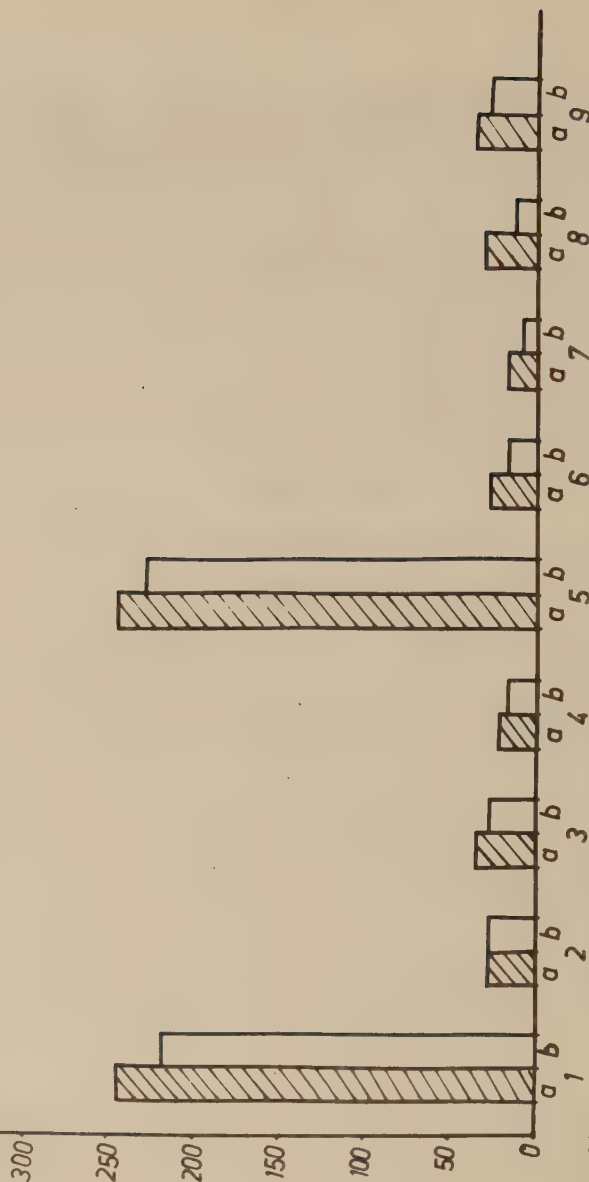


Abb. 28

Pyruvatgehalt der verschiedenen vitaminisierten Proben nach 1 und 2 Wochen
(a = nach 1 Woche und b = nach 2 Wochen)

- 1 = vitaminfrei
- 2 = voll-vitaminisiert
- 3 = Biotin-Mangel
- 4 = Inosit-Mangel
- 5 = Thiamin-Hydrochlorid-Mangel
- 6 = Pyridoxin-Hydrochlorid-Mangel
- 7 = Nikotinsäure-Mangel
- 8 = p-Aminobenzolsäure-Mangel
- 9 = Pantothensäure-Mangel

Diskussion der Ergebnisse:

Die CO_2 -Bildung in den einzelnen Proben zeigt deutlich, daß die Gärung bei Vitaminmangel verlangsamt ist. Bei Mangel einzelner Vitamine kommt es zu keiner nennenswerten Beeinträchtigung der Gärintensität. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der Aussage von CANTARELLI (7), der feststellen konnte, daß Vitamine keinen Einfluß auf die Gärung haben. Bei seinen Versuchen verwandte CANTARELLI nicht vitaminisierte Nährlösungen, sondern Traubenmost. In gewissem Sinne sind daher die eigenen und die Beobachtungen CANTARELLIS kein Widerspruch.

Biologische Substrate enthalten von Natur aus Vitamine in wechselnden Konzentrationen. Wenn der Bedarf der Hefe an Vitaminen bereits gedeckt ist, wird eine Erhöhung des Vitamin-gehaltes kaum zu sichtbaren Effekten führen.

Die Tatsache, daß Pantothenat-Mangel zu einem erhöhten Acetaldehydgehalt führt, erklärt sich aus der Funktion der Pantothensäure im Stoffwechsel.

Pantothensäure ist ein Bestandteil des Coenzym A. Dieses Coenzym wird beim Abbau von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A benötigt und nimmt somit eine Schlüsselstellung beim Abbau der Kohlenhydrate zu CO_2 und Wasser ein. Beim Fehlen von Pantothensäure ist der Weg zum Citronensäure-Zyklus gesperrt und die Abläufe werden vermehrt in Richtung Acetaldehyd gedrängt.

3.4. Abhängigkeit der Gärung von den Stickstoffquellen im Substrat

Verschiedene Wissenschaftler haben sich mit dem Einfluß von verschiedenen Stickstoffquellen auf die Gärintensität beschäftigt. CANTARELLI (10) fand, daß die Gärung im Most durch Zugabe von Stickstoffquellen beschleunigt wird. Vor allem bei Zusatz von Ammoniumsalzen, Aminosäuren, Amiden und komplexen Nährstoffe in Form von Hefe-Extrakt und ähnlichem wird die Gärintensität vergrößert. Die Stickstoffanreicherung beeinflusst den Gärverlauf

sowohl durch die Produktion von Hefen als auch durch die Aktivierung der Gärung, die wiederum auf den höheren N-Gehalt der Hefen zurückzuführen ist.

WUCHERPENNIG (113) bestätigt dieses Ergebnis in Bezug auf die komplexen Stickstoffquellen. Durch die Zugabe von 10 ml/l Casein-Hydrolysat bzw. Hefe-Autolysat wurde eine enorme Erhöhung des Alkoholgehaltes erreicht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 9 wiedergegeben.

Tabelle 9

Einfluß von Casein-Hydrolysat und Hefe-Autolysat auf
die Alkoholbildung in natürlichen Substraten

Hefe-Autolysat ist eine natürliche Vitaminquelle, die dazu noch das hefeeigene Eiweiß in aufgeschlossener Form enthält.

Im durchgegorenen Wein setzt sich die Hefe ab. Dabei nimmt sie den größten Teil der Vitamine mit in das Depot. Damit die Vitamine verfügbar werden, müssen sie aus den Zellen durch Autolyse gelöst werden. Um dies zu erreichen, wird Bierhefe für einige Stunden auf 50 - 60° C erwärmt.

Sowohl bei Zusatz von Casein-Hydrolysat als auch bei Zusatz von Hefe-Autolysat wird die Alkoholbildung begünstigt. Beim Zusatz von 10,0 cm³ Autolysat oder Hydrolysat wird sogar ein Alkoholgehalt von 18,65 Vol. % erreicht, der normalerweise schon die physiologischen Grenzen der Hefe übersteigt.

TANNER (104) berichtet darüber, daß Hefenährsalze - eine Mischung aus Stickstoffquellen und Vitaminen - die rasche Durchgärung von Kernobstmaischen, die normalerweise schlecht gären, gewährleisten. Mit der Assimilation von Aminosäuren beschäftigten sich SANDEGREN und Mitarbeiter (92). Sie fanden, daß bei Versuchen mit Würze das gesamte Angebot an untersuchten Aminosäuren umgesetzt wurde, während bei synthetischen Nährlösungen nur knapp 50 % und teilweise sogar nur 10 % aufgenommen wurde.

T a b e l l e 9

Einfluß von Casein Hydrolysat und Hefe-Autohydrolysat auf die

Alkoholbildung in Weinen

Nr.	Hydrolysatzusatz cm ³	Tage	Alkohol Vol. %		14.	17.
			5.	10.		
1	0,1	6,89	7,65	9,4	12,2	-
2	1,0	7,05	8,2	11,6	14,1	-
3	10,0	7,05	9,4	14,5	17,7	18,65
Nr.	Autohydrolysatzusatz cm ³					
4	0,1	6,97	7,8	9,12	11,4	-
5	1,0	6,97	8,2	9,7	10,0	-
6	10,0	6,81	8,55	13,84	17,4	18,65

Da die vorangegangenen Versuche aber wiederholt gezeigt hatten, daß ein niedriger Acetaldehydgehalt oft mit einer zügigen Gärung in Zusammenhang steht, während bei schleppenden Gärungen grundsätzlich höhere Acetaldehydgehalte gemessen wurden, liegt der Schluß nahe, daß eine optimale Stickstoffversorgung zu einem niedrigen Acetaldehydgehalt führen kann.

In den folgenden Untersuchungen sollen diese Fragen geklärt werden.

Zu diesem Zweck wurde eine Nährlösung auf den pH-Wert 3,6 eingestellt. Die Zusätze zu den einzelnen Proben wurden in jeweils 20 ml Wasser gelöst und zugemischt. Zum Vergleich kamen 220 ml Würze aus einer Brauerei zur Vergärung. Die Würze wurde unverändert belassen.

Die sieben Proben setzten sich folgendermaßen zusammen:

1. Würze
2. Nährlösung, vollsynthetisch + 3 g/l Pepton aus Casein
3. Nährlösung, vollsynthetisch + 10 g/l Hefe-Extrakt
4. Nährlösung, vollsynthetisch 1 g/l Asparagin
5. Nährlösung, vollsynthetisch versch. Vitamine
6. Nährlösung, vollsynthetisch versch. Vitamine
3 g/l Pepton
3 g/l Hefe-Extrakt
1 g/l Asparagin
7. Nährlösung, vollsynthetisch -

Die Gärung fand bei 26° C statt. Die Gärintensität konnte anhand der CO₂-Produktion verfolgt werden. In Abständen wurden Acetaldehyd, Pyruvat und Äthanol bestimmt.

Ergebnisse:

Die gemessenen Einzelwerte sind in Tabelle 10 gegenübergestellt.

Tabelle 10

Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Bildung von
Gärungszwischen- und Gärungsendprodukten

T a b e l l e 10

Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Bildung von Gärungszwischen- und Gärungsendprodukten

Nr.	zusätzliche N-Quelle	Zusatzmenge g/l	Vitamin= zusatz	Acetaldehyd mg/l nach Tagen	7	14	21	Pyruvat mg/l n. Tagen	14	21	Äthanol g/l
1	Stärke	-	-	33	9	15		57,5	35,4		4,8
2	Penton	3	-	48	57	57		214,4	216,6		7,5
3	Hefe-Extrakt	10	-	14	69	137		75,1	39,3		7,4
4	Asparagin	1	-	77	68	83		214,4	207,7		7,5
5	-	-	+	24	26	26		17,7	8,8		6,8
6	Nr. 2,3,4 zusammen	3,3,1	+	12	164	250		26,5	13,3		7,2
7				-	30	42	42		221,0	207,7	

Die CO_2 -Bildung in den Proben ist in Abbildung 29 graphisch dargestellt.

Abbildung 29

CO_2 -Bildung im Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von
der Stickstoff- und Vitaminversorgung der Hefe

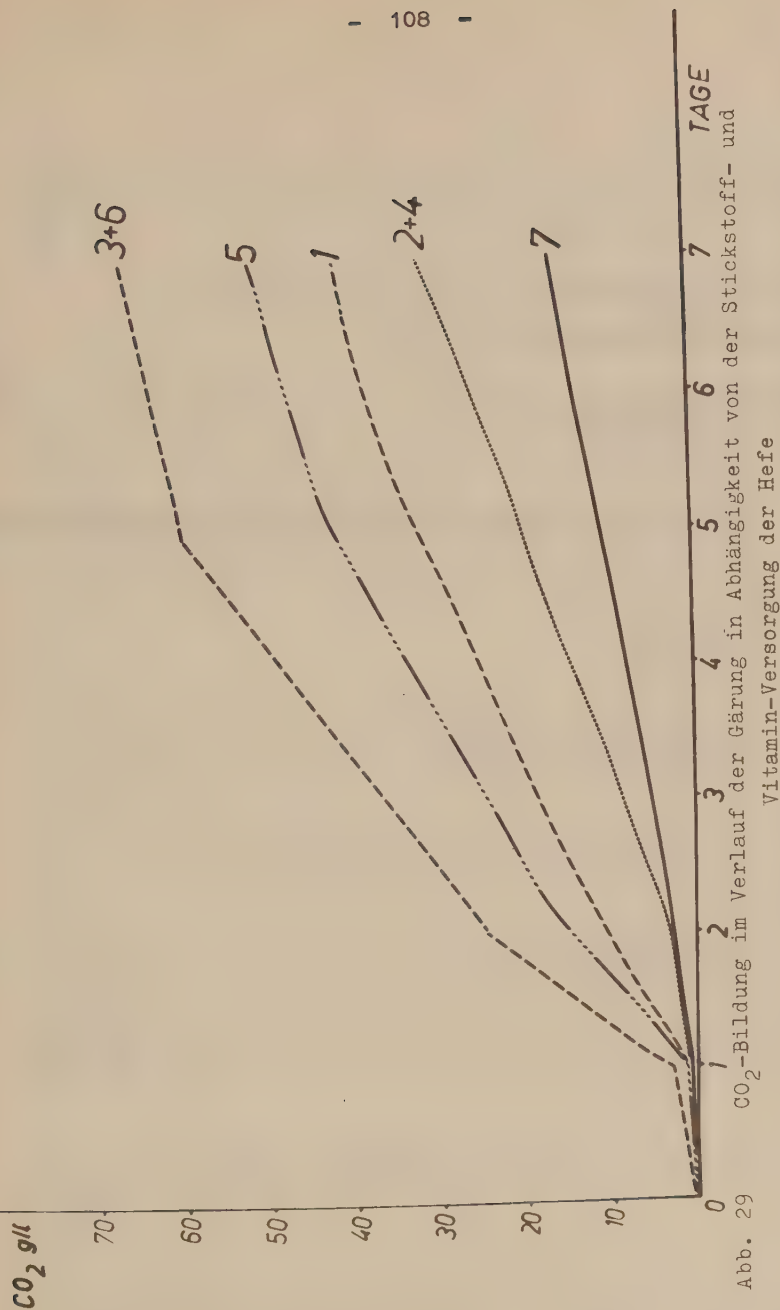
Wie man der Abbildung entnehmen kann, ist die Probe 1, Bierwürze, mit eingezeichnet. Die CO_2 -Entbindung in der Würze kann aber nicht mit der in den anderen Proben verglichen werden, da der Anfangszuckergehalt hierin nicht auf 130 g/l eingestellt worden war. Die Würze zeigt gute Gäreigenschaften, bleibt aber in der CO_2 -Produktion zurück, da der Gehalt an vergärbaren Zuckern relativ niedrig war.

Am schlechtesten gärt wieder die Probe ohne Zusätze, in diesem Fall Probe Nr. 7. Die Gärintensität der mit Hefe-Extrakt versetzten Probe ist vier mal so groß, die der vitaminisierten Probe drei mal so groß wie die der vollsynthetischen Versuchsvarianten. Dazwischen liegen die mit Asparagin und Pepton aus Casein versehenen Proben.

Auf der Abbildung sind die Proben Nr. 3 und 6 sowie 2 und 4 zusammengefaßt. Diese Proben liegen im Verlauf der Gärung in Bezug auf die CO_2 -Bildung nahe beieinander.

Nachdem die Gärung abgeschlossen schien, wurde auch Äthanol durch Wägung bestimmt. Die Gehalte sind in Tabelle 10 niedergeschrieben. Die Tabelle zeigt, daß die Würze bzw. das Gärungsprodukt Bier einen relativ niedrigen Alkoholgehalt hat. Damit ist die bei der Abhandlung über die CO_2 -Bildung geäußerte Vermutung, daß die Würze einen geringeren Anfangszuckergehalt hatte als die übrigen Varianten erneut bestätigt. Der niedrige Alkoholgehalt der Probe Nr. 7 deutet darauf hin, daß sie noch nicht durchgegoren ist, während der Gehalt in den übrigen Proben annähernd gleich ist.

Abb. 29



3 + 6 = Mittel der Werte von der Probe mit Hefe-Extrakt und Vitaminen
 5 = vitaminisierte Proben
 1 = Würze
 2 + 4 = Mittel der Werte von Probe mit Pepton- und Asparagin-Zusatz
 7 = vollsynthetische Lösung

Der Gehalt an Acetaldehyd nach einer, zwei und drei Wochen ist in Abbildung 30 graphisch dargestellt.

Abbildung 30

Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Bildung von
Acetaldehyd im Verlauf der Gärung

Die Abbildung zeigt, daß die Proben, die mit Hefe-Extrakt vermischt worden waren, nach einer Woche den niedrigsten Acetaldehydgehalt hatten. Probe Nr. 4, die einen Asparaginzusatz erhielt, unterschied sich zwar nicht so sehr von den Proben Nr. 2 und 5 in Bezug auf die Gärintensität, hatte aber schon nach einer Woche einen wesentlich höheren Acetaldehydgehalt. Er lag sechs mal so hoch wie der in den Proben Nr. 3 und 6, die mit Hefe-Extrakt versetzt waren.

Bereits nach zwei Wochen zeigt sich aber ein vollkommen verändertes Bild. Die Proben waren außer Nr. 7 bereits durchgegoren und trotzdem änderte sich der Acetaldehydgehalt noch erheblich. Gerade bei den Proben Nr. 3 und 6, die anfangs den niedrigsten Acetaldehydgehalt hatten, stieg dieser rapide an. Die gleiche Tendenz zeigte sich nach 3 Wochen in noch stärkerem Maße. Probe Nr. 6 roch sogar sehr stark nach Acetaldehyd. Probe Nr. 1, die vergorene Würze, zeigte nach 2 und 3 Wochen die niedrigsten Werte, gefolgt von der voll-vitaminierten Probe, die in diesem Versuch denselben Acetaldehydgehalt hatte wie in den vorangegangenen Versuchen. Die übrigen Proben hatten recht hohe Werte, die sich aber dennoch deutlich von den mit Hefe-Extrakt ernährten Proben absetzten.

Aus Abbildung 31 ist der Pyruvatgehalt nach 2 und 3 Wochen Gärdauer in Abhängigkeit von der Nährstoffversorgung des Substrates zu ersehen.

Abbildung 31

Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Pyruvatbildung

ABB. 30



Abb. 30

Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Bildung von Acetaldehyd im Verlauf der Gärung

- 2. Pepton
- 3. Hefe-Extrakt
- 4. Asparagin
- 5. Vitamine
- 6. verschiedene N-Quellen und Vitamine
- 7. vollsynthetische Lösung
- 1. Würze

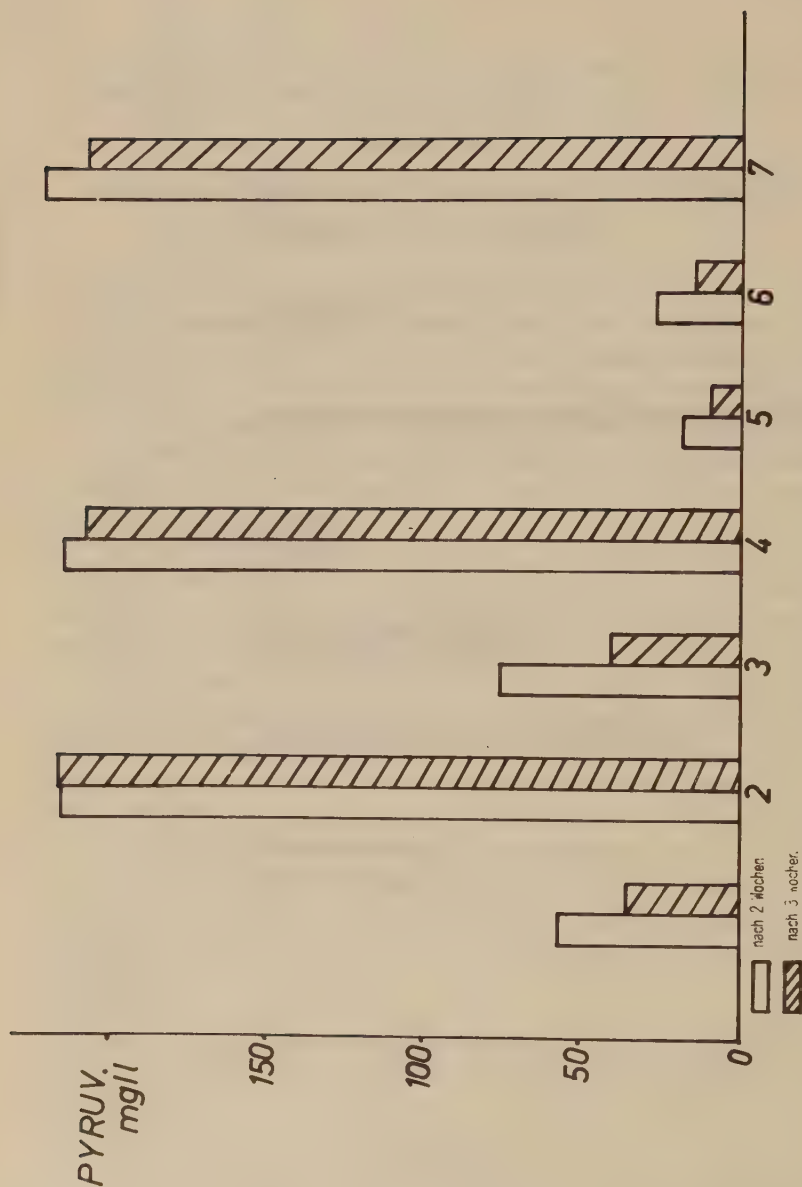


Abb. 31

Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Pyruvatbildung

- 1. Würze
- 2. Peptonzusatz
- 3. Hefeextrakt
- 4. Asparagin
- 5. Vitamine
- 6. versch. N-Quellen
- 7. synth. Nährlösung

Die Werte bestätigen erneut die vorher gefundenen Ergebnisse. Die vitaminfrei ernährten Hefen sind nicht in der Lage das jeweils produzierte Pyruvat vollständig abzubauen. In den Proben Nr. 2, 4 und 7 kommt es zu einem Pyruvatstau. Probe Nr. 2 ist mit Pepton aus Casein angereichert, Nr. 4 mit Asparagin und Nr. 7 ist vollsynthetisch. Die übrigen Proben haben Vitaminzusätze direkt oder im Zusammenhang mit der Stickstoffquelle bekommen und zeigen normale Pyruvatwerte.

Diskussion der Ergebnisse:

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, daß der Acetaldehyd-gehalt am Ende der Hauptgärung in nährstoffreichen Substraten sehr niedrig ist. Aber gerade die Proben, die die größte Gärgeschwindigkeit hatten und nach einer Woche nur sehr wenig Acetaldehyd enthielten, zeigen nach 2 Wochen unerwartet hohe Acetaldehydwerte, die nach 3 Wochen noch mehr gestiegen waren; der Acetaldehyd war hier sogar ohne Messung deutlich wahrnehmbar. Dieser anfangs niedrige und danach schnell ansteigende Acetaldehydgehalt weist deutlich darauf hin, daß die Hefe nach bereits abgeschlossener Gärung noch in Tätigkeit war.

Da ihr keine Glucose mehr zur Verfügung stand, baute sie Äthanol ab, und es kam daher nach bereits abgeschlossener Gärung zu bedeutenden Acetaldehydakkumulationen. Dieser Entwicklung kann aber mit einem rechtzeitigen Abstich oder einer Inaktivierung der Hefe entgegengetreten werden. Bei richtiger Betrachtung der Acetaldehydbildung ergibt sich daraus, daß ein stickstoff- und vitaminreiches Substrat die Vorbedingung für einen niedrigen Acetaldehydgehalt ist. Daß er danach wieder ansteigt, ist eine altbekannte Tatsache, die allein durch die Fortsetzung der Gärung bedingt ist.

In ganz geringem Maße macht sich die aufgezeigte Tendenz auch bei der Vergärung der Würze bemerkbar.

In Proben mit hohen Glucoseausgangskonzentrationen stellt sich der Acetaldehydgehalt am Ende der Gärung meist auf einen festen

Wert ein, da die Hefe durch die hohe Alkoholkonzentration inaktiviert wird. Gerade bei der Herstellung von Dessertweinen dürfte diese Feststellung von Bedeutung sein. Die weniger gut ernährten Hefen sind am Ende der Gärung an Nährstoffen verarmt und stellen dann von selbst die Tätigkeit ein. Grundsätzlich hat sich aber bestätigt, daß die Qualität des Substrates von großem Einfluß auf den Gehalt an Acetaldehyd ist. Unter Qualität ist in diesem Fall das Vorhandensein von Mineralstoffen, Vitaminen und im richtigen Verhältnis zueinander stehenden Stickstoffquellen zu verstehen. Große Mengen an einzelnen Aminosäuren, wie z. B. Asparaginsäure in Probe Nr. 4, führten nicht zu einem niedrigen Acetaldehydgehalt.

3.6. Einfluß von Schönungsmitteln auf den Gehalt an Acetaldehyd im Substrat

Nach VOGT (109) bezeichnet man mit einem Ausdruck "Schönen und Stabilisieren" die Klärung der Weine durch Zusatz bestimmter Stoffe, die entweder durch Oberflächenanziehung die Trübungsteilchen niederreißen, oder die mit einem Bestandteil des Weines eine kolloide Flockung geben, welche die Trubteilchen einhüllt und mit zu Boden zieht.

3.6.1. Stabilisierung mit Bentonit

Bentonite, feinpulvrige, kaolinähnliche Mineralien, werden zur Behandlung von eiweißinstabilen Weinen benutzt (72). Nach VOGT (109) sind die zur Weinbehandlung am besten geeigneten Bentonite, die in Wyoming vorkommenden Montmorillonit-Tonerden, die aus komplexen Silikaten von Al, Mg, Ca und etwas Fe bestehen und vulkanischen Ursprunges sind. 1 g dieses sehr quellfähigen Materials hat eine Oberfläche von 50.000 cm^2 . Seine Teilchen sind negativ geladen und vermögen daher die Ladung der positiven Eiweißteilchen zu neutralisieren und damit das Eiweiß zur Ausflockung zu bringen. Außer Eiweiß werden auch Amine von Bentonit

adsorbiert (65).

Nach Angaben von POMPEI (81) wirkt Bentonit, vor der Gärung dem Saft zugemischt, auch vermindert auf den Acetaldehydgehalt im späteren Wein. Die Verringerung, verglichen mit einem unbehandelten Most, lag bei 15 - 50 %. Es ist anzunehmen, daß infolge verminderter Aminierungsprozesse weniger Acetaldehyd entstanden ist. Die im folgenden beschriebenen eigenen Versuchen befassen sich mit der Frage, ob Bentonit unter Umständen auch in der Lage ist, Acetaldehyd zu adsorbieren.

Bentonitbehandlung nach der Gärung.

Material und Methoden

Material:

Schönungsgefäße: 1 l Schliffstandzylinder mit Schliffstopfen

Substrat: Modelllösung mit Acetaldehyd (64 mg/l Aca + SO₂)

Schönungsmittel: Bentonit (Geisenheimer Erde)

Methoden:

1,7 g Aca und 4,93 g K₂S₂O₅ wurden in einen 100 ml Kolben eingewogen, auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt und über Nacht stehen gelassen. 4 ml dieser Lösung wurden zu 1 l Wasser im Standzylinder gegeben, gut umgeschüttelt und anschließend wurde der Acetaldehydgehalt in dieser Lösung bestimmt. 20 ml der Lösung wurden dann zum Anrühren des Bentonitpulvers herausgenommen. Das gut angerührte Pulver wurde in die Standzylinder gegeben, intensiv vermischt und nach mehrmaligem Schütteln über Nacht stehengelassen. Am nächsten Tag wurde in der überstehenden Flüssigkeit der Acetaldehyd bestimmt. Es waren drei Proben angesetzt worden. Zu der ersten waren 5 g/l, zu der zweiten 10 g/l Bentonit zugesetzt worden. Die dritte Probe diente als Vergleich. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle 11 wiedergegeben.

Tabelle 11

Einfluß von Schönungen auf den Acetaldehydgehalt
in Modelllösungen

T a b e l l e 11

Einfluß von Schönungen auf den Gehalt an Acetaldehyd in Modellösungen

Nr.	Schönungsmittel	Menge g/l	mg Acetaldehyd /l
1	Bentonit	5	65
2	Bentonit	10	65
3	Vergleich	—	66
4	Gelatine und Kieselöl	0,1 + 1,5 ml	65,5
5	Clarocarbon G	0,4	67
6	—	—	66

Die Werte in Tabelle 11 zeigen sehr deutlich, daß die Stabilisierung mit Bentonit keinen Einfluß auf die Menge an Acetaldehyd-schweiflige Säure hat.

3.6.2. Kohleschönung

Fein gepulverte und gereinigte Holz- oder Knochenkohle besitzt eine starke Adsorptionskraft für Gerb- und Farbstoffe sowie für Geruchs- und Geschmacksstoffe. Die ungewöhnlich große Oberfläche bewirkt eine Bindung dieser Stoffe. Zur Klärung der Frage, ob durch Kohle auch Acetaldehyd bzw. Acetaldehyd-schweiflige-Säure aus einer Lösung entfernt wird, wurde eine Modelllösung mit steigenden Mengen Kohle in der Weise behandelt wie es bei den Versuchen mit Bentonit beschrieben wurde.

Die Ergebnisse des Versuches sind in Tabelle 11 niedergeschrieben und zeigen, daß der Erfolg mit der Kohleschönung nicht größer war als mit der Bentonitbehandlung. In anderen Versuchen wurde der Einfluß von Aktivkohle auf den Acetaldehydgehalt einer alkoholhaltigen Modelllösung untersucht. Zu diesem Zweck wurde die beschriebene Lösung auf einer Schüttelmaschine mit Kohle behandelt. Dazu wurden je 0,5 g Aktivkohle (20 - 35 mesh) zu 5 ml der acetaldehydhaltigen Modelllösung in ein 15 ml Schliff-reagenzglas gegeben. Die Proben wurden mit 1 ml destilliertem Wasser oder 1 ml Äthanol absolut versetzt und für verschieden lange Zeiten geschüttelt. Die Ergebnisse des Versuches sind in Tabelle 12 gegenübergestellt.

Tabelle 12

Einfluß von Aktivkohle auf den Gehalt an Acetaldehyd in Gegenwart von Äthanol

Wie die Tabelle zeigt, wurde der Acetaldehydgehalt in den Proben nicht ausgerechnet, sondern lediglich die Extinktion notiert, da seine absolute Größe für die Aussage vollkommen

Tabelle 12

Einfluß von Aktivkohle auf den Gehalt an Acetaldehyd in Gegenwart

von Äthanol

Nr.	H ₂ O in ml Zusatz	Äthanol in ml Zusatz	Zeit in Std.	Extinktion
1	1	-	1	0,17
2	-	1	1	0,24
3	1	-	2,5	0,155
4	-	1	2,5	0,24
5	1	-	96	0,105
6	-	1	96	0,2

bedeutungslos ist. Hier sollte lediglich ein Vergleich angestellt werden.

Die Extinktion nach einer, nach 2,5 und nach 96 Stunden zeigt, daß der Acetaldehydgehalt in der alkoholhaltigen Lösung höher liegt als in der alkoholfreien. Es ist möglich, daß dieser Acetaldehyd im Verlauf des Schüttelprozesses aus dem Äthanol neu gebildet worden ist oder - was wahrscheinlicher ist - mit dem Alkohol in die Probe gekommen ist.

Mit Sicherheit steht jedoch fest, daß eine Behandlung mit Aktivkohle nicht zur Senkung des Acetaldehydgehaltes in Lösungen beiträgt.

3.6.3. Gelatine-Kieselcol-Schönung

Die Wirkung der Klärmittel zu denen auch Gelatine gehört, beruht darauf, daß sie chemische Umwandlungen an den die Trübung verursachenden Stoffen bewirken.

Die im Saft und Wein positive Ladung der Gelatine bedingt, daß negativ geladene Kolloidteilchen, die im Getränk in großer Menge vorkommen können, elektrisch entladen werden. Dadurch wird die abstoßende Wirkung der Teilchen untereinander aufgehoben, sie ballen sich zusammen und flocken aus. Die ausgeflockten Teilchen sedimentieren, der Wein klärt sich. Neben diesem reinen Ausflockungseffekt verbindet sich aber noch der Eiweißstoff Gelatine mit den mehr oder weniger kondensierten Polyphenolen des Weines. Es entsteht also zwischen den beiden Stoffen eine echte Verbindung. Diese ist wasserunlöslich; sie flockt aus und sedimentiert ebenfalls. Insgesamt kommt es aufgrund der Entladungsvorgänge der kolloidalen Teilchen und des Entstehens der chemischen Verbindung zwischen Gelatine und Polyphenolen zur Ausflockung der Trubteilchen und zur Klärung des Getränkes. Die Schönungstechnik beruht also auf Koagulation und Unlöslichwerden von kolloidalen Stoffen und Fällung der kondensierten Polyphenole und Eiweiße.

Bei den nun folgenden Versuchen wurden die gleichen Methoden gewählt wie bei der Stabilisierung mit Bentonit. Anstelle von Bentonit kamen aber die Schönungsmittel Gelatine und KieselsoI zur Anwendung. Die Gelatinelösung wurde wie folgt hergestellt:

0,5 g Blattgelatine wurden in 10 ml Wasser unter Erwärmen gelöst. 2 ml dieser Lösung wurden zusammen mit 1,5 ml 15 %-igem KieselsoI zu einem Liter acetaldehydhaltiger Modellösung gegeben. Die Ergebnisse des Versuches sind in Tabelle 11 wiedergegeben. Die Tabelle zeigt, daß - ebenso wie bei der Schönung mit Bentonit - der Acetaldehydgehalt auch in diesem Fall nicht abnahm.

4. Gewinnung von Enzymen zum Acetaldehyd-Abbau

Die vorangegangenen Versuche haben gezeigt aus welchen Gründen die verschiedenen Weine recht unterschiedliche Mengen an Acetaldehyd enthalten und weswegen der SO_2 -Bedarf außerordentlich differiert. Weiter haben die Untersuchungen ergeben, daß es gärungstechnisch kaum gelingen wird, den Acetaldehydgehalt am Ende der Gärung vollständig abzubauen und damit SO_2 einzusparen. Es lag nun nahe, darüber Versuche anzustellen, den Acetaldehyd chemisch zu zerstören oder ihn enzymatisch in Alkohol oder Essigsäure umzuwandeln. Dabei dürfte die aus Acetaldehyd gebildete Menge an Essigsäure keine Rolle spielen, da im Durchschnitt nur 60 - 80 mg Acetaldehyd vorkommen.

Es gelingt zwar in einfacher Weise den Acetaldehyd z. B. mit Semicarbazid abzufangen, jedoch ist Semicarbazid aus lebensmittelrechtlicher und hygienischer Sicht noch weniger erwünscht als schweflige Säure, da es wie diese lebensmittelfremd und dazu gesundheitlich noch bedenklicher ist. Versuche mit Oxydationsmitteln scheiterten, da diese unspezifisch sind und vorzugsweise Alkohol zu Acetaldehyd oxydieren, sodaß im Endeffekt der Gehalt der Weine an Acetaldehyd steigt. Auch Versuche mit Reduktionsmitteln brachten nicht den gewünschten Erfolg.

Eine andere Möglichkeit besteht im enzymatischen Abbau des Acetaldehyds. Nach THEN (105) sorgt die Alkoholdehydrogenase durch Hydrierung des Acetaldehyds für dessen Weiterreaktion. Es ist auch bekannt, daß NADH und ADH in einer reversiblen Reaktion Acetaldehyd abzubauen vermögen. Dieser Vorgang liegt der enzymatischen Alkoholbestimmung zugrunde. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt auf der Seite des Alkohols. Die Verhältnisse im Wein sind durchaus vergleichbar; denn der größte Teil an Acetaldehyd wird wie erwähnt im Verlauf der Gärung zu Äthanol hydriert. Bei Zufuhr von Sauerstoff wird aber, wie KIELHÖFER berichtet (52), das Gleichgewicht leicht zugunsten des Acetaldehyds verschoben und wieder ein Teil des Äthanol von der ruhenden Hefe zu Acetaldehyd dehydriert. Geringe Mengen entstehen durch nicht enzymatische Effekte.

ADH kommt verbreitet in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen vor; am besten untersucht ist die der Hefe und der Säugetierleber. Das pH-Optimum für die Wirksamkeit des Enzyms aus Hefe wird mit 7,8 angegeben; dasjenige der Fermente aus tierischem Material liegt bei 7,6. Die Reduktion des Acetaldehyds geht weitaus rascher vor sich als die Oxydation des Äthanol.

Eine weitere Möglichkeit zum enzymatischen Abbau des Acetaldehyds besteht in seiner Dehydrierung mit Hilfe einer Aldehyd-Dehydrogenase. Bekannt ist eine Reaktion dieser Art im Zusammenhang mit der Dismutation im tierischen Gewebe. Dabei ist von RACKER (82) das Zusammenwirken zweier NAD spezifischer Enzyme nachgewiesen worden. Das erste ist die beschriebene ADH, das zweite eine NAD abhängige Aldehyd-Dehydrogenase. Die Wirkung dieser Enzyme läßt sich durch folgende Gleichung beschreiben:

Gleichung 16:



Die Enzyme sind in Bezug auf das Pyridinnucleotid absolut spezifisch. Ihre Spezifität gegenüber dem Acetaldehyd ist nur relativ. Formaldehyd, Glykolaldehyd usw. werden wesentlich

langsamer dehydriert. Das pH-Optimum der Wirksamkeit liegt bei 9,3.

Die Gewinnung einer Aldehyd-Dehydrogenase aus Hefe wurde von STEINMANN und JAKOBY (99) beschrieben.

Außer den genannten Enzymen kommt noch eine Aldehyd-Oxidase in Frage deren Reaktions-Optimum bei dem pH-Wert 7,0 liegt.

4.1. Material und Methoden

4.1.1. Material:

Zur Herstellung von Enzympräparaten wurden ausschließlich Mikroorganismen benutzt. Es handelte sich dabei um *Mucor racemosus* und *Aspergillus niger* aus dem Institut für Mikrobiologie der Hessischen Lehr- und Forschungsanstalt in Geisenheim, Bäckerhefe aus dem Handel und Bierhefe aus einer Brauerei. Bei der Brauereihefe handelte es sich um die untergärige Hefe *Saccharomyces carlsbergensis*. Weiter wurde *Apiculatus Klöckera*, gemischt mit anderen Apfelweihenfen aus einer Frankfurter Apfelweinkelterei, verarbeitet.

Schließlich wurde versucht aus dem Hefegeläger eines Weines, das etwa 4 Monate alt war, die gesuchten Enzyme zu gewinnen.

Als Substrat, in dem der Acetaldehydabbau gemessen wurde, diente eine Modellösung, die sich qualitativ folgendermaßen zusammensetzte:

Weinsäure,
..
Äpfelsäure,
1 n NaOH,
Acetaldehyd,
Kaliumpyrosulfit,
Äthanol

Außer dieser Modellösung wurde auch ein Rheingauer Wein (Riesling) als Substrat eingesetzt.

Als Pufferlösungen wurden ein 0,1 molarer di-Kaliumhydrogenphosphat-Puffer, der mit 0,1 molarer Natronlauge auf den pH-Wert 8 eingestellt wurde, eine Zitronensäure-Phosphat-Puffer und ein Sörensen-Puffer benutzt. Bei der Herstellung des Zitronensäure-Phosphat-Puffers wurden Säure und di-Kaliumhydrogenphosphat in der Weise gemischt, daß sich pH-Werte von 3, 4, 5, 6 und 7 einstellten. Im einzelnen wurden die in der nachfolgenden Aufstellung wiedergegebenen Mengen vermischt.

Zitronensäure-Phosphat-Puffer bei verschiedenen pH-Werten:

pH	Zitronensäure, 0,1 m in ml	K_2HPO_4 , 0,2 m in ml
3	7,94	2,06
4	6,14	3,86
5	4,85	5,15
6	3,68	6,32
7	1,76	8,24

Beim Sörensen-Puffer wurde in der Weise vorgegangen, daß eine 0,1 molare di-Kaliumhydrogenphosphat- und eine 0,1 molare Kaliumdihydrogenphosphatlösung in der Weise am pH-Meter gemischt wurden, daß sich die gewünschten pH-Werte einstellten.

ADH und NAD sowie NADH waren von Böhringer, Mannheim, bezogen; DEAE Cellulose, Typ 70, von Schleicher und Schuell.

4.1.2. Methoden

4.1.2.1. Mikroorganismenzüchtung

Die Pilze wurden sowohl diskontinuierlich in Fernbach-Kolben als auch kontinuierlich in einem Fermenter auf Apfelsaft gezogen, der einen pH-Wert von etwa 3,5 hatte. Die diskontinuierliche

Züchtung brachte größere Ausbeuten und wurde bevorzugt. Um besonders die Enzyme zu aktivieren, die den Acetaldehyd abbauen, wurde dem Nährsubstrat freier Acetaldehyd zugesetzt. Eine Zugabe von 500 mg/l Acetaldehyd bewirkte ein Absterben der Kulturen im Nährmedium. Die Zugabe von kleinen Mengen Acetaldehyd, ca. 80 mg/l, hatte keinen bemerkenswerten Effekt auf das Wachstum. Eine Zugabe von 50 mg SO_2 in Form von Kaliumpyrosulfit bewirkte ein Absterben der Pilze. Wurde die SO_2 durch Acetaldehyd abgebunden, blieb ihre wachstumshemmende Wirkung aus.

4.1.2.2. Aufarbeitung der Kulturen

Bereits STEINMANN und JAKOBY (99) haben eine Aldehyd Dehydrogenase aus Hefe isoliert und auch kristallin dargestellt. Da aber im Rahmen dieser Arbeit nicht die Aufgabe bestand, ein solches Enzym möglichst rein zu isolieren, sondern nur die Anwendung verschiedener Aldehyd abbauender Enzyme beim pH des Weines und in Verbindung mit anderen Weininhaltsstoffen zu überprüfen war, wurde die Aufarbeitungsmethode in verschiedenen Punkten abgeändert und vor allem wesentlich gekürzt.

Es hatte sich als zweckmäßig erwiesen, 120 g Hefe mit 90 g Glaspulver und 75 ml einer 0,3 molaren di-Kaliumhydrogenphosphat-Lösung in einer Kugelmühle 20 Minuten lang zu zerreiben. Das zerkleinerte Produkt wurde sofort danach bei 10.000 Upm zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde gesammelt und mit einer ein molaren Zitronensäure-Lösung auf einen pH-Wert von 5,1 gebracht. Dabei trübte sich die Lösung, und die entstandene Fällung wurde abzentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde verworfen. Der Rückstand wurde in einer 0,03 molaren di-Kaliumhydrogenphosphat-Lösung suspendiert und entweder direkt zur Messung benutzt oder weiter gereinigt. Die Reinigung erfolgte mit DEAE Cellulose und einem linearen Ionengradienten zur Elution.

Der Aufbau der zur Reinigung benutzten Apparaturen ist in Abbildung 32 schematisch wiedergegeben.

Abbildung 32

Schema der Anlage zur Reinigung des Enzymes
mittels DEAE Cellulose

Die Abbildung zeigt, daß der 0,5 molare Puffer mit Hilfe einer Dosierpumpe in das Vorratsgefäß für den 0,1 molaren Puffer gefördert wurde. Mit einer zweiten Pumpe wurde dieser Puffer, dessen Molarität linear zunahm, durch die Säule mit DEAE Cellulose gefördert. Das Eluat wurde in eine Durchflußküvette geleitet, wo die Absorption bei einer Wellenlänge von 253,5 nm gemessen wurde. Anschließend wurde das Eluat in Fraktionen von je 6 ml in einem Fraktionssammler gesammelt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden dann auf ihre Aktivität untersucht. Auf diese Weise wurde festgestellt, welche Fraktion Acetaldehyd abbauende Enzyme enthielt.

Zur Vorbereitung der DEAE Cellulose wurde diese vor ihrer Benutzung sechs mal mit der 400 fachen Menge Wasser gewaschen. Die feinen Teilchen wurden jeweils entfernt. Die sedimentierten Teilchen wurden dann zwei mal mit dem bei der Chromatographie benutzten Puffer gewaschen. Nach dem Füllen der Säule wurden 100 ml des später benutzten Puffers durch die Säule gefördert bevor die Proteinlösung aufgetragen wurde.

Andere Reinigungsmethoden für Enzyme waren erfolglos geblieben. Sie wurden folgendermaßen gehandhabt:
600 g Bäckerhefe wurden zwecks Reinigung in ca. drei Liter destilliertem Wasser aufgeschlämmt, mit Zitronensäure auf einen pH-Wert von 3 eingestellt und abgesaugt. Der Prozeß wurde wiederholt. Zur Herbeiführung einer Autolyse der Hefe wurde diese mit Trockeneis und Methanol, mit Xylol und Aceton und Aceton allein behandelt. Die mikroskopische Untersuchung zeigte aber nach jeder dieser Behandlungsarten, daß die Zellen weitgehend unversehrt geblieben waren.

Die Isolierung der Enzyme aus *Mucor racemosus* und *Aspergillus niger* wurde im großen und ganzen auf dieselbe Art und Weise

1 - 0,1 m K_2HPO_4
2 - 0,5 m "
G - MAGNETRÜHRER
P - PUMPE
S - SÄULE
M - UV-MONITOR
F - FRAKTIONSSAMMLER

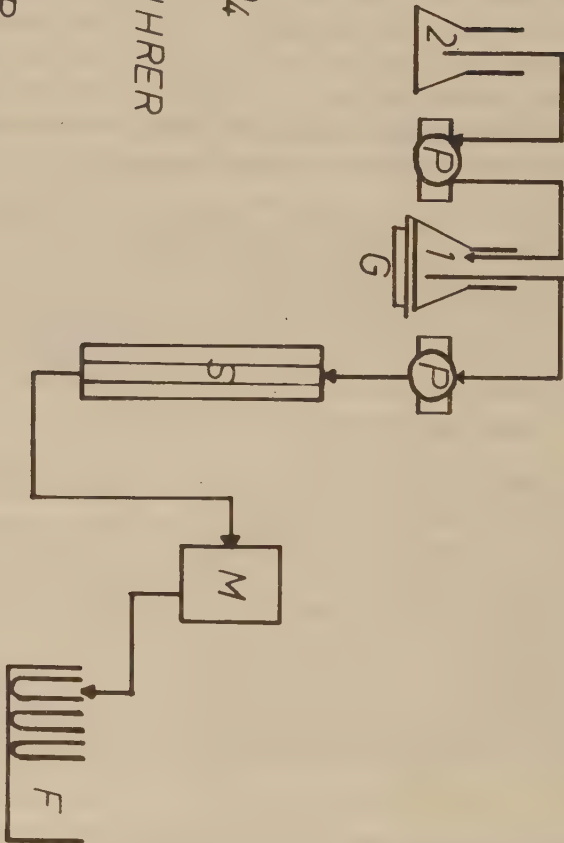


Abbildung 32

Abb. 32 Schema der Anlage zur Reinigung des Enzyms mittels DEAE Cellulose

durchgeführt. Das Zellmaterial wurde mit 90 g Glaspulver und einem 0,1 molaren Phosphatpuffer, der 6,6 g/l Ammoniumsulfat enthielt und auf den pH-Wert 7 eingestellt worden war, vermischt. Nach dem Abkühlen der Mischung auf ca. +5° C erfolgte die Zerkleinerung in der Kugelmühle (10 min., höchste Drehzahl). Anschließend wurde das Macerat 15 Minuten lang auf 55° C erwärmt. Die Mischung wurde dann schnell wieder abgekühlt und bei 0° C und 10.000 Upm zentrifugiert. Dem Zentrifugieren folgte eine Fällung mit Ammoniumsulfat. Zu diesem Zweck wurde die in einem Becherglas gesammelte überstehende Lösung mit Ammoniumsulfat gesättigt. Um eine vollständige Fällung zu erreichen, wurde die Lösung über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Am folgenden Tag wurde die Fällung abzentrifugiert und in einem Puffer suspendiert. Diesem Schritt folgte, ebenso wie bei der Hefeaufbereitung, eine Fraktionierung und Reinigung des Enzymes mit Hilfe von DEAE Cellulose und einem linearen Ionengradienten.

4.1.2.3. Aktivitätsbestimmungen:

Die Aktivität der Enzyme in den jeweiligen Präparaten wurde sowohl chemisch über die Abnahme an Acetaldehyd als auch optisch über die NADH-Zunahme bestimmt.

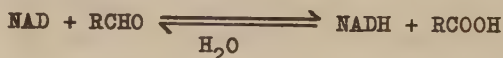
Bei der chemischen Methode wurden jeweils einige Milliliter einer enzymhaltigen Suspension oder auch Macerat direkt in 25 ml Erlenmeyer-Kolben gegeben, die 10 oder auch 15 ml des acetaldehydhaltigen Substrates enthielten. Das Substrat war teilweise alkoholfrei, teils alkoholhaltig. Der pH-Wert war auf 2,9 bis 3,2 eingestellt worden. Generell enthielt die Modelllösung 2,5 g Weinsäure und 4,0 g Äpfelsäure im Liter. Der Acetaldehyd war an SO₂ gebunden. Sofern dies nicht der Fall war, ist es gesondert vermerkt.

In einigen Versuchen wurde an Stelle der beschriebenen Modelllösung ein Rheingauer Wein (Riesling) zur chemischen Aktivitätsmessung eingesetzt. In bestimmten Zeitabständen wurde der

Acetaldehydgehalt in den Proben nach REBELEIN (85) bestimmt. Die Methode erfaßt sowohl den freien, als auch den an SO_2 gebundenen Acetaldehyd. Eine Abnahme des Acetaldehydgehaltes nach definierten Zeiten war ein Maß für die Aktivität des Enzympräparates.

Die optische Aktivitätsbestimmung erfolgte in der Weise, daß die Extinktion bei 340 nm gemessen wurde.

Die Extinktionszunahme ist ein direktes Maß für die gebildete Menge an NADH. Die Reaktion die in der Küvette ablaufen kann, hat folgenden Mechanismus:



Reaktionsschema zur enzymatischen Bestimmung von Acetaldehyd mit Hilfe der Aldehyddehydrogenase aus verschiedenen Mikroorganismen.

Reduziertes NAD besitzt ein breites Absorptionsmaximum bei 340 nm, während NAD ox hier nicht absorbiert. Entsteht nun während einer Reaktion NADH, so nimmt die Absorption bei 340 nm allmählich zu. Der Anstieg der Lichtabsorption wird als Übergang von NAD^+ NADH optisch verfolgt. Die Zunahme der Absorption pro Zeiteinheit ist ein direktes Maß der Reaktionsgeschwindigkeit.

Die Messung erfolgte mit einem Beckmann Spectralphotometer DU in 1 cm Glasküvetten gegen Puffer. Das Reaktionsgemisch setzte sich folgendermaßen zusammen:

2,8 ml Puffer

0,5 ml Probe

0,2 ml einer Lösung die 10 mg NAD pro ml enthielt = 2 mg NAD

0,1 ml einer Lösung die 44,1 mg Aca pro ml enthielt =
4,41 mg Acetaldehyd.

Es wurden sowohl ein Puffer, der einen pH-Wert von 8 hatte, als auch ein Zitronensäure-Phosphat-Puffer und ein Sörensen-Puffer, die sich um pH-Werte von 3 bis 7 bewegten, eingesetzt.

4.2. Ergebnisse der Versuche zum Acetaldehydabbau mit verschiedenen Enzymen unter verschiedenen Bedingungen.

4.2.1. Acetaldehydabbau mit ADH und NADH

Wie bereits erwähnt, sorgt ADH durch Hydrierung von Acetaldehyd für dessen Weiterreaktion zu Äthanol. In Versuchen mit ADH aus Hefe konnte festgestellt werden, daß die ADH lediglich im Beisein ihres Coenzymes, bzw. Cosubstrates NADH einen Acetaldehydabbau bewirkt.

Die Ergebnisse der Versuche, in denen die Aktivität der ADH unter verschiedenen Bedingungen geprüft wurde, sind in Tabelle 13 wiedergegeben.

Tabelle 13

Abbau von Acetaldehyd mittels ADH und NADH

Zur Reaktion des Enzymes und des Nucleotides mit der jeweiligen Modellösung, die entweder Acetaldehyd oder Äthanol enthielt, wurden bei Nr. 1 - 6 jeweils 10 ml Modellösung in ein Schliffreagenzglas pipettiert und verschlossen; bei Nr. 7 - 9 wurden je 20 ml in ein 25 ml Erlenmeyerkölbchen pipettiert, der mit einem Gummistopfen fest verschlossen wurde.

Die in der Tabelle angegebene Menge ADH und NADH wurde einge-mischt und die Lösung zur Reaktion stehen gelassen. Die Messung des Acetaldehydgehaltes erfolgte nach 18 Std., 4, 5 1/2, 7, 7 1/2 und 11 Tagen. Bei der Zugabe von ADH allein war absolut keine Acetaldehydabnahme zu verzeichnen. Bei der Probe, die außer Acetaldehyd 10 % Äthanol enthielt stellte sich nach 4 Tagen bei 18 % Abnahme ein Gleichgewicht ein. Die Probe, die keinen Acetaldehyd sondern nur Äthanol enthielt, zeigte eine Acetaldehyd-Zunahme von ca. 25 mg/l nach 7 Tagen; der pH-Wert war auf 6,5 eingestellt. Eine Parallelprobe, pH-Wert 3,05 zeigte nach 7 Tagen keinen Acetaldehydgehalt an. Die Proben, in denen nur Acetaldehyd abzubauen war, zeigen eine lineare Aldehydabnahme, die in Abhängigkeit vom pH-Wert nach 2 oder 3 Tagen im Bereich der

T a b e l l e 13

Abbau von Acetaldehyd mit ADH und NADH

Nr.	Zu- oder Abnahme in %	Zeit	Substrat ml	pH	ADH ml	Acetaldehydgeh. der Modellsg.	Athanolgeh. der Modellsg.	NADH
1	0	4 Tg	10	3,0	0,05	105 mg/l	-	-
2	-20	4 Tg	10	3,0	0,05	105 mg/l	-	7 mg
3	-18	4 Tg	10	3,0	0,05	105 mg/l	10 %	7 mg
4	0	11 Tg	10	3,0	-	105 mg/l	-	-
5	+25	7 Tg	10	6,5	0,05	-	10 %	7 mg
6	0	4 Tg	10	3,05	0,05	-	10 %	7 mg
7	-100	11 Tg	20	2,6	0,1	105 mg/l	-	20 mg
8	0	11 Tg	20	2,6	-	105 mg/l	-	-
9	-100	11 Tg	20	2,9	0,1	105 mg/l	-	20 mg

Meßbarkeit liegt. Nach 11 Tagen war auch bei der Probe mit einem pH-Wert 2,6 eine 100 %-ige Abnahme zu verzeichnen, während die zum Vergleich angesetzte Probe - ohne ADH und NADH - einen kaum meßbaren Verlust an Acetaldehyd erlitten hatte.

Bei sehr niedrigen pH-Werten findet nach entsprechend langen Zeiten ein Acetaldehydabbau statt. Im Beisein von Äthanol stellt sich lediglich ein Gleichgewicht ein. Dieser Befund und die Tatsache, daß sehr große Enzymmengen bei langen Einwirkungszeiten verwendet werden müssen, macht den Abbau von Acetaldehyd mittels ADH in Lösungen ganz allgemein unwirtschaftlich; wenn Alkohol vorhanden ist, wie im Wein, ist er unmöglich.

4.2.2. Acetaldehydabbau mit Aldehyd-Dehydrogenase aus Hefe

4.2.2.1. pH-Einfluß auf die Aktivität

STEINMANN und JAKOBY (99) haben eine Aldehyd-Dehydrogenase aus Bäckerhefe isoliert und rein dargestellt. Sie haben die Aktivität ihres Produktes aber nur bei dem pH-Wert 8 gemessen, wo für die benutzte Hefe ein Aktivitätsoptimum liegen muß. Da aber Wein einen wesentlich niedrigeren pH-Wert hat, interessierte uns die Aktivität im Bereich einer höheren Wasserstoffionenkonzentration. Das Enzym wurde grob vorgereinigt und Aktivitätsmessungen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt.

Bei der Feststellung wurde ein Photometer mit Schreiber verwendet. Die Meßwerte, die nach 20 Minuten erhalten wurden, sind in Tabelle 14 wiedergegeben. Der zeitliche Verlauf der Extinktionszunahme ist in Abbildung 33 A graphisch wiedergegeben.

Tabelle 14

Extinktionszunahme beim Abbau von Acetaldehyd mit
Aldehyd-Dehydrogenase aus frischer Bäckerhefe

T a b e l l e 14

Extinktionszunahme beim Abbau von Acetaldehyd mit Aldehyddehydrogenase aus Hefe

Nr.	pH	Zeit der Reaktion in min	Änderung der Absorption in %
1	8	20	32
2	7	20	17
3	6	20	1,5
4	5	20	0
5	4	20	0

Abbildung 33 A

Graphische Darstellung der in Tabelle 14 wieder-
gegebenen Werte

Das Ergebnis zeigt, daß beim pH-Wert des Weines kein Abbau des Acetaldehyds zu erwarten ist. Das Wirkungsoptimum der Fermente liegt bei pH 8. Die Aktivität sinkt bei einem pH-Wert von 7 auf die Hälfte ab, und kommt bei pH 6 fast ganz zum Verschwinden.

4.2.2.2. Einfluß des Hefealters auf die Aktivität

Es ist bekannt, daß man Mikroorganismen durch Veränderungen der Zusammensetzung der Nährlösung gewünschte Eigenschaften anzüchten kann, und daß sich auch bei der Lagerung Eigenschaften verändern können.

Deshalb wurden Versuche mit 3 Wochen im Kühlschrank gelagerter Hefe durchgeführt. Die Aufarbeitung unterschied sich nicht von der des vorangegangenen Versuches. Das Ergebnis ist in Tabelle 15 und Abbildung 33 B wiedergegeben.

Tabelle 15

Extinktionszunahme beim Abbau von Acetaldehyd mit einer
Aldehyd-Dehydrogenase aus alter Bäckerhefe

Abbildung 33 B

Graphische Darstellung der in Tabelle 15 wiedergegebenen Werte

Die Ergebnisse zeigen, daß in alter, d. h. für einige Wochen im Kühlschrank gelagerter Hefe, ein Enzym enthalten sein muß, das noch bei einem pH-Wert 3 eine gewisse Aktivität aufweist - wenn auch in wesentlich geringerem Maße als bei dem pH-Wert 7.

ABB.33

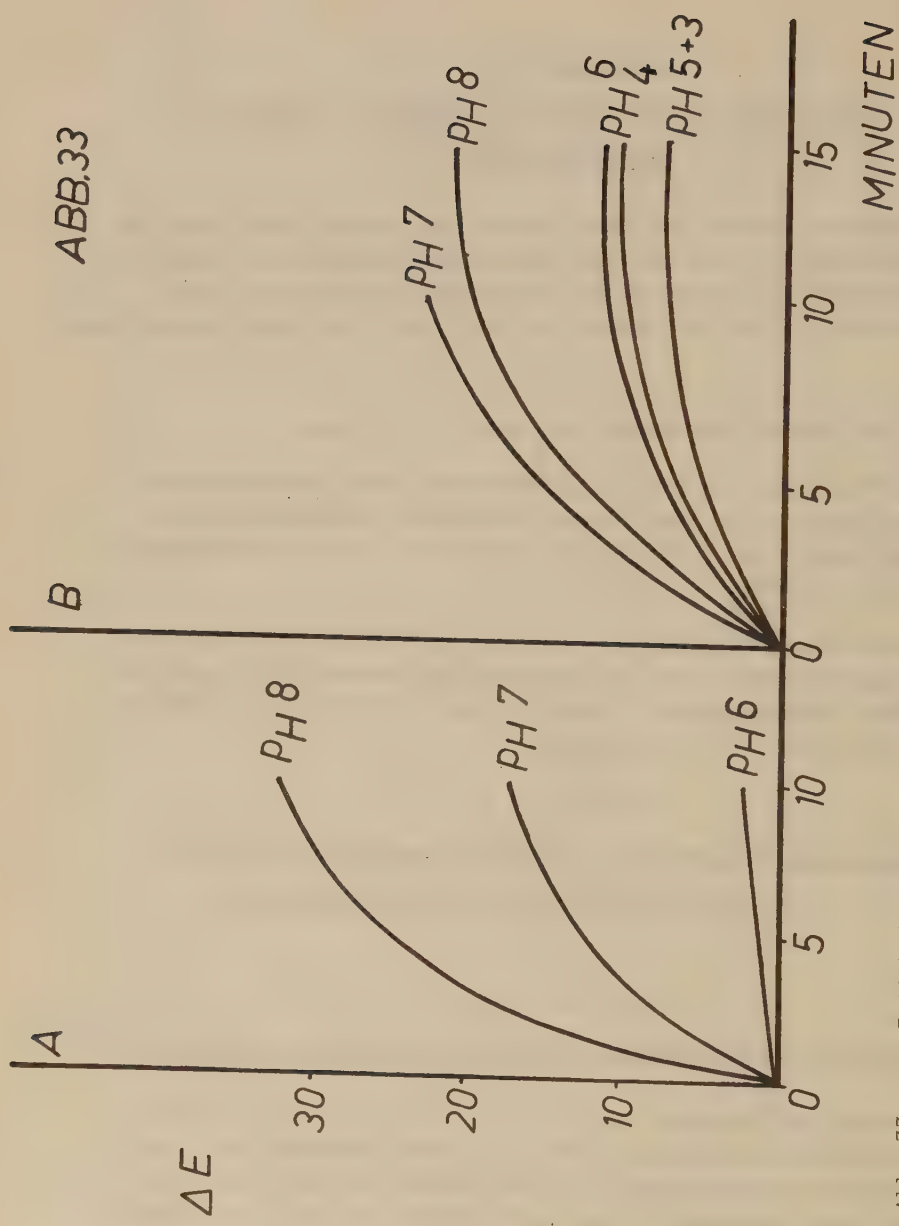


Abb. 33 Extinktionszunahme beim Abbau von Acetaldehyd mit einer Aldehyd-Dehydrogenase
A = aus frischer Bäckerhefe und B = aus alter Bäckerhefe

T a b e l l e 15

Extinktionszunahme beim Abbau von Acetaldehyd mit einer Aldehyd Dehydrogenase
aus alter Bäckerhefe

Nr.	pH	Puffer z. Lösen Molarität	Zeit in Min.	Änderung der Absorption %
1	8	0,3	15	4,2
2	8	0,1	15	21
3	7	0,1	10	23
4	6	0,1	15	11
5	5	0,1	15	7
6	4	0,1	15	10
7	3	0,1	15	7

Bei Anwendung im Wein müßten dann sehr große Enzymmengen eingesetzt werden, um einen Acetaldehydabbau zu bewirken. Die praktische Durchführung dürfte deswegen aus wirtschaftlichen Gründen auf Schwierigkeiten stoßen.

Dieser Befund gab Anlaß dazu nach einem Mikroorganismus zu suchen, der Acetaldehyd abbauende Enzyme enthielt, die aber ihr Optimum im sauren Bereich haben.

Aufgrund früherer, auch im Institut durchgeführter Versuche, kam dafür *Mucor racemosus* in Betracht. Der Pilz scheint außer Fumarsäure auch Essigsäure über den Fructosediphosphat-Weg zu bilden und müßte in diesem Fall auch eine Aldehyd-Dehydrogenase besitzen. Die Züchtung bereitete keine Schwierigkeiten und konnte ohne weiteres auf Apfelsaft durchgeführt werden. Das Wachstum bei einem so niedrigen pH-Wert könnte sogar zur Aktivierung der Enzyme führen, die bei hohen Wasserstoffionenkonzentrationen aktiv sind.

4.2.3. Enzym aus *Mucor racemosus*

4.2.3.1. Ergebnisse mit Rohextrakten

Das Mycel wurde wie beschrieben zerkleinert. Dann wurde ein Puffer-Enzym-Rohextrakt hergestellt und eine Zitronensäure Fällung durchgeführt. Mit der in Puffer suspendierten bzw. gelösten Fällung wurde eine Aktivitätsmessung bei pH-Werten von 6 - 8 durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, daß in allen Fällen keine Aktivität vorhanden war. Erst die Messungen bei einem pH-Wert 4 und vorwiegend bei einem pH-Wert von 3 zeigte gerade meßbare Aktivitäten. Das Ergebnis ist in Tabelle 16 und Abbildung 34 A wiedergegeben.

Tabelle 16

Extinktionszunahme beim Abbau von Acetaldehyd mit
Enzymen aus *Mucor racemosus*

T a b e l l e 16

Extinktionszunahme beim Abbau von Acetaldehyd mit Enzymen aus *Mucor racemosus*

Nr.	pH	Zeit in Min.	positive Absorptions- änderung in %
1	3	10	10 - 13
2	4	10	6
3	6	10	0,5
4	8	10	negativ
5	3	10	7

Abbildung 34 A

Graphische Darstellung der in Tabelle 16 wiedergegebenen Werte

Die Tabelle und die Abbildung zeigen, daß bei pH 3 eine meßbare Aktivität vorhanden ist, die mit steigenden pH-Werten abnimmt, bei pH 6 fast auf 0 sinkt und bei dem pH-Wert von 8 sogar eine negative Extinktion, d. h. Abnahme anstelle der erwarteten Zunahme zeigt. Die Extinktionsabnahme kann auf eine Klärung der leicht trüben Meßflüssigkeit zurückzuführen sein oder aber auf die Wirkung eines Enzymes, welches in der Probe vorhandenes NADH zu NAD oxydiert. Die zweite Erklärung scheint allerdings ziemlich unwahrscheinlich.

4.2.3.2. Einfluß der Reinigung auf die Aktivität

Beobachtungen bei der Reinigung des Enzymes und bei den Aktivitätsmessungen:

Bei der Reinigung des Enzymes wurde festgestellt, daß sich das gefällte Enzym weder in einem 0,3 molaren, noch in einem 0,1 molaren Puffer löste. Es bildete sich lediglich eine milchige Suspension. Bei einem pH-Wert von 3 führte die starke H^+ -Ionenkonzentration zur Koagulation des Eiweißes und in Verbindung damit zur Extinktionsabnahme nachdem die eigentliche Reaktion in der Küvette längst abgelaufen war. Um die Suspension zu klären, wurde sie in den folgenden Versuchen vor der Messung scharf abzentrifugiert, und nur die überstehende Flüssigkeit wurde zu weiteren Messungen benutzt; bei den vorangegangenen Untersuchungen wurde ja festgestellt, daß eine gewisse Aktivität vorhanden war. Verschiedene Werte zu diesen Versuchen sind aus Tabelle 17 zu ersehen.

Tabelle 17

Extinktionszunahme beim Abbau von Acetaldehyd mit zentrifugierten und in Suspension belassenen Enzymen

Wie die Tabelle zeigt, unterscheidet sich die Aktivität in den zentrifugierten Proben kaum von der in den unbehandelten.

ABB. 34

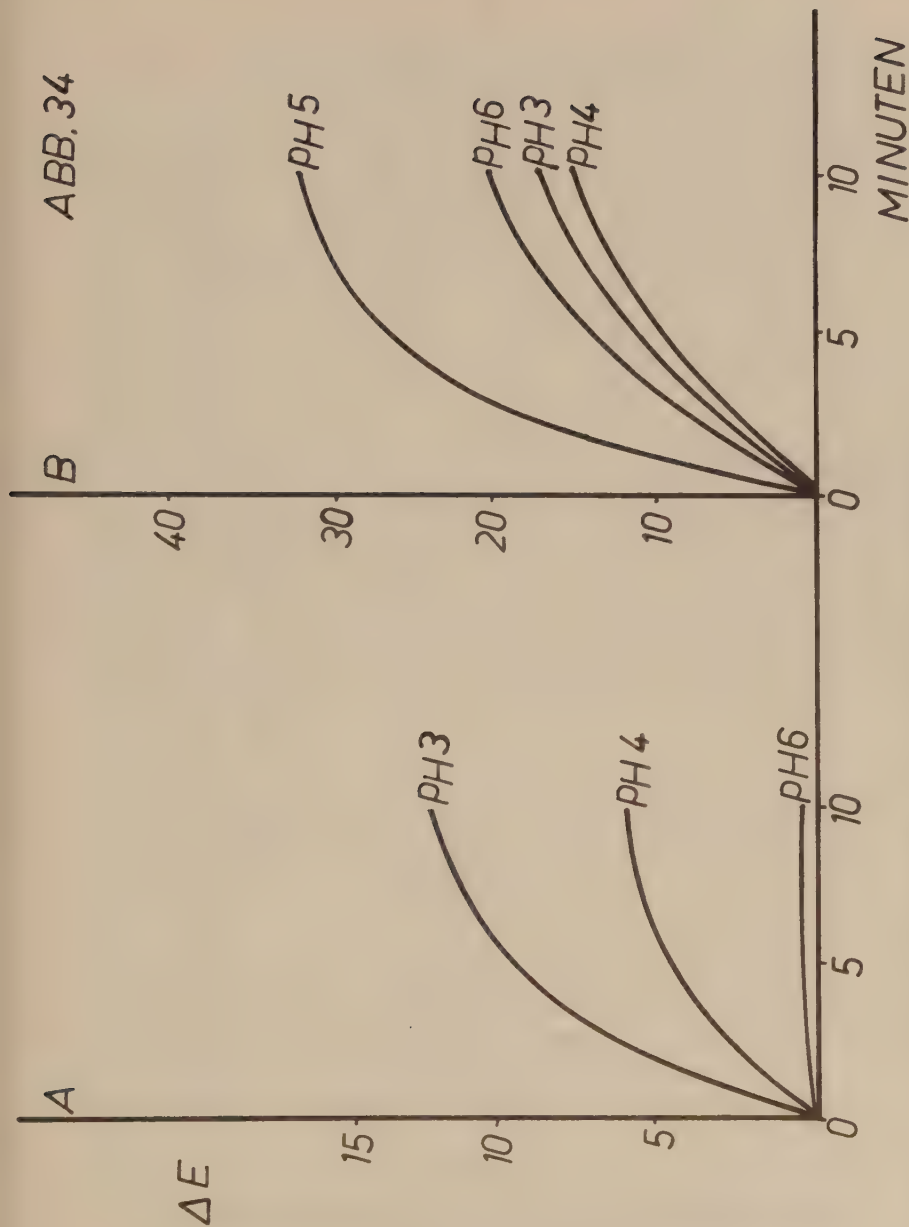


Abb. 34 Extinktionszunahme beim Abbau von Acetaldehyd
 A = mit Enzymen aus *Mucor racemosus*
 B = mit einer Aldehyd-Dehydrogenase aus Bierhefe

T a b e l l e 17

Extinktionszunahme beim Abbau von Acetaldehyd mit zentrifugierten und in

Suspension belassenen Enzymen

Nr.	pH	Behandlung	Meßzeit in Min.	positive Absorptions- änderung in %
1	3	-	15	5,2
2	3	zentrifugiert	15	9
3	4	-	15	8
4	4	zentrifugiert	15	7,5
5	5	-	15	6
6	8	-	15	0

Es schien deshalb angebracht, die Suspension weiter über DEAE Cellulose zu reinigen, und auf diese Weise das enzymatische Eiweiß von dem nicht enzymatischen zu trennen. Zunächst wurde dazu eine Hochdrucksäule von 60 cm Länge und einem Innendruckmesser von 0,7 cm mit sorgfältig vorbereiteter DEAE Cellulose gefüllt. Wie aus dem Schema in Abbildung 32 zu ersehen ist, wurde diese Säule dann einerseits über eine Pumpe mit dem Puffervorratsgefäß und andererseits mit dem UV-Monitor verbunden.

Bevor nun die Proteinlösung auf die Säule aufgetragen wurde, wurden 100 ml des 0,1 molaren Kaliumpuffers durch die Füllung gefördert. Dann wurde 1 ml der Proteinlösung auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit einem linearen Ionengradienten (0,1 - 0,5 M K_2HPO_4) eluiert. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 1,5 ml / min. Bevor das Eluat in den Fraktionssammler einlief, in dem es in Fraktionen von 6 ml gesammelt wurde, wurde die Extinktion im UV-Monitor, der mit einer Durchlaufküvette ausgestattet ist, bei 253,5 nm gemessen und aufgezeichnet. Das bei dieser Wellenlänge erhaltene Absorptionsdiagramm ist in Abbildung 35 in Fraktionen dargestellt.

Abbildung 35

Absorptionsmaxima des Eluates einer DEAE-Cellulose-Säule
im UV-Bereich bei der Reinigung einer Enzymlösung aus Mucor
racemosus

Der eiweißhaltige Teil des Eluates war in fünf Fraktionen enthalten; diese wurden auf ihre Enzymaktivität untersucht. Der Puffer der Untersuchungslösungen hatte bei 5 Messungen einen pH-Wert von 3 und bei der sechsten einen pH-Wert von 4. Das Ergebnis dieser Meßreihe ist in Tabelle 18 wiedergegeben.

Tabelle 18

Extinktionszunahme beim Abbau von Acetaldehyd mit
Enzymen aus den Fraktionen des Eluates

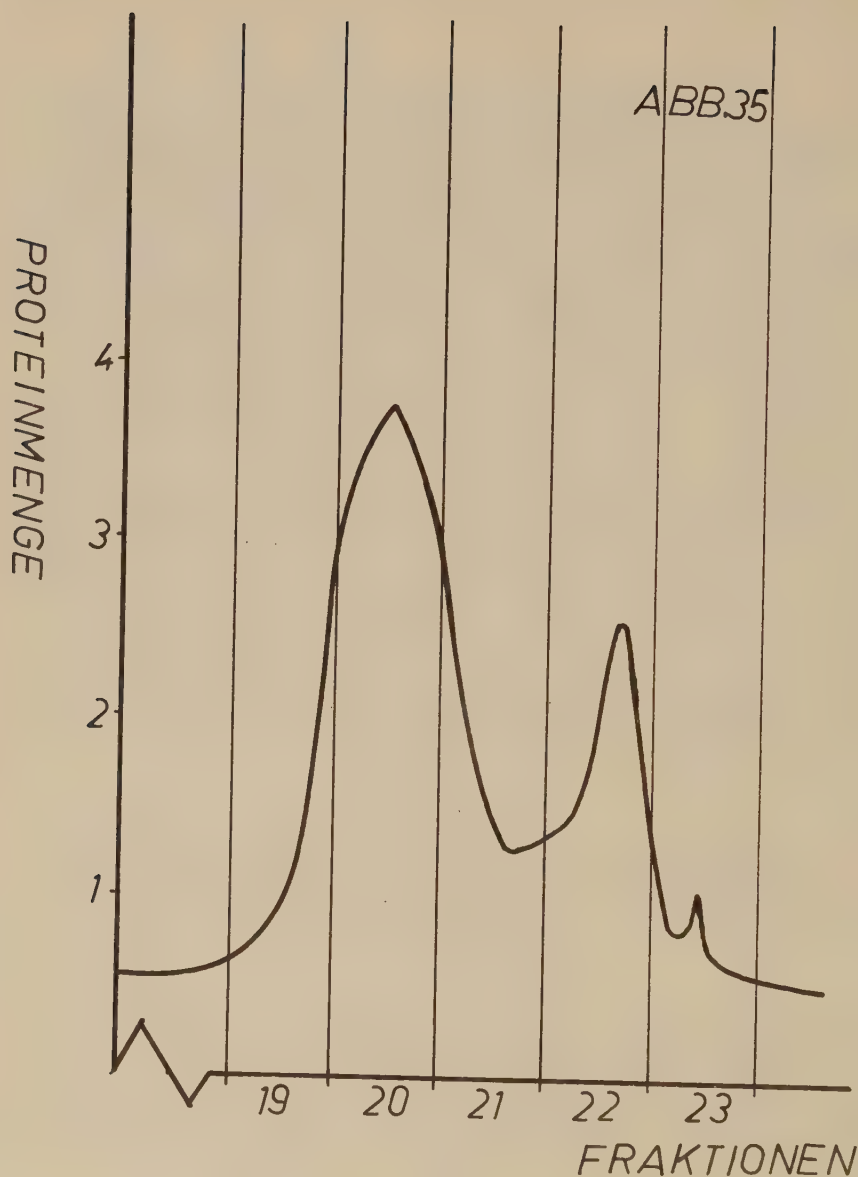


Abb. 35 Absorptionsmaxima des Eluates einer DEAE-Cellulose-Säule im UV-Bereich bei der Reinigung einer Enzymlösung aus *Mucor racemosus*

T a b e l l e 18

Extinktionszunahme beim Abbau von Acetaldehyd mit Enzymen aus den Fraktionen

eines Eluates

Nr.	pH	Fraktion	Zeit Messdauer min.	positive Änderung der Absorption in %
1	3	1	15	0
2	3	2	15	4
3	3	3	15	25
4	3	4	15	0
5	3	5	15	0
6	4	3	15	0

Da während der Messung eine Trübung in Abhängigkeit vom pH-Wert auftrat - diese war bei niedrigen pH-Werten größer als bei hohen pH-Werten - wurde nicht mehr gegen Puffer sondern gegen eine Puffer-Enzymlösung, die Acetaldehyd aber kein NAD enthielt, gemessen. Auch in der Probe ohne NAD war scheinbar eine gute Enzymaktivität zu messen, die etwa 50 % der Aktivität in der Probe mit NAD ausmachte.

Die Feststellungen von scheinbaren positiven Aktivitäten veranlaßten uns, die Meßmethoden zu ändern, da offensichtlich eine sichtbar werdende Trübung die Extinktionszunahme bedingte.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam man bei Messungen mit Bierhefe-Extrakten. Es sei vorweggenommen, daß hierbei auch keine tatsächlichen Aktivitäten gemessen wurden, sondern die Trübung Enzymaktivitäten vortäuschte.

4.2.4. Enzym aus Bierhefe

Über das Ergebnis der Untersuchungen mit einem aus Bierhefe gewonnenen Enzym berichten Tabelle 19 und Abbildung 34 B.

Tabelle 19

Extinktionszunahme beim Abbau von Acetaldehyd mit einer
Aldehyd-Dehydrogenase aus Bierhefe

Abbildung 34 B

Graphische Darstellung der in Tabelle 19 wiedergegebenen Werte

Die Proben Nr. 1 - 6 wurden gegen Puffer gemessen. Das Reaktionsgemisch der Probe Nr. 6 unterscheidet sich insofern von den übrigen Versuchsvarianten als es zwar auch gegen Puffer gemessen wurde, im Reaktionsgemisch selbst aber kein NAD enthielt. Da auch in dieser Probe eine Extinktion gemessen wurde, obwohl die Reaktion nicht hätte ablaufen dürfen, ist es klar, daß die Extinktion tatsächlich auf eine Trübung oder einen gewissen

T a b e l l e 19

Extinktionszunahme beim Abbau von Acetaldehyd mit einer Aldehyd Dehydrogenase

aus Bierhefe

Nr.	pH	Gegenprobe	Reaktionsgemisch	Zeit min.	Extinkt.
1	3	Puffer	vollständig	10	17
2	4	Puffer	vollständig	10	15
3	5	Puffer	vollständig	3	32
4	6	Puffer	vollständig	10	20
5	7	Puffer	vollständig	10	0
6	5	Puffer	ohne NAD	3	10
7	5	Puffer-Enzymlösung mit Acetald.	vollständig	3	20

NAD-Gehalt der Enzym-Probelösung zurückzuführen ist. Da die Hefe NAD enthält ist die zweite Möglichkeit nicht unbedingt auszuschließen. Probe Nr. 7 wurde gegen eine Puffer-Enzymlösung, die Acetaldehyd enthielt, gemessen. Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, unterscheidet sich die Extinktion in diesem Fall um 10 Einheiten von der gegen Puffer gemessenen.

Da die spektralphotometrische Messung des entstehenden reduzierten Nucleotides NADH durch Trübung gestört wurde, dasselbe aber auch für die Messungen bei pH 3 der vorausgegangenen Versuche angenommen werden muß, ist es nötig, die Ergebnisse zu überprüfen. Aus diesem Grunde wurde die Abnahme des Acetaldehydgehaltes nach der chemischen Methode festgestellt.

4.2.5. Die Wirkung verschiedener Enzyme auf den Äthanol- und den Acetaldehydgehalt einer Modelllösung.

Die chemische Bestimmung des Acetaldehydgehaltes ist zwar etwas umständlicher als die optische Aktivitätsmessung; die Methode hat jedoch den Vorteil, daß man den tatsächlichen Acetaldehydabbau ermittelt.

Bei den Versuchen wurden Acetaldehydlösungen hergestellt, die Enzyme zugesetzt und die Veränderung im Acetaldehydgehalt wurde in verschiedenen Zeitabständen bestimmt. Als Substrat diente eine Modelllösung, die 10 Vol. % Alkohol, 4 g Äpfelsäure, 2,5 g Weinsäure, 175 g Acetaldehyd, 880 ml destilliertes Wasser und 22 ml 1 normale NaOH pro Liter Lösung enthielt. Die Lösung wurde in zwei 500 ml-Kolben gefüllt. Zu einer der beiden Proben wurden 280 mg $K_2S_2O_5$ zugesetzt und die Lösung blieb über Nacht zur Reaktion stehen. Der pH-Wert war auf pH 3,3 eingestellt worden. Der Acetaldehydgehalt wurde nach der Methode von REBELEIN (85) mit Nitroprussitnatrium und Piperidin bestimmt. Eine Enzymlösung, die im spektralphotometrischen Test Aktivität gezeigt hatte, wurde zugegeben und nach einer unterschiedlichen Stundenzahl wurde der Acetaldehydgehalt gemessen. Tabelle 20 zeigt das Ergebnis der Untersuchungen.

Tabelle 20

Einfluß eines Enzymes aus Mucor racemosus auf den
Acetaldehydgehalt eines alkoholhaltigen Modellweines

Wie die Tabelle zeigt, tritt praktisch keine Veränderung des Acetaldehydgehaltes mit und ohne SO_2 ein. Die unterschiedliche Extinktion in den beiden Reihen ist dadurch zu erklären, daß nach der Vorschrift von REBELEIN der Wein vor der Messung mit Aktivkohle behandelt wird. Dabei wird freier Acetaldehyd in größerem Umfang adsorbiert, während an SO_2 gebundener praktisch nicht adsorbiert wird.

Insgesamt zeigt diese Versuchsreihe, daß ein Acetaldehydabbau mit entsprechenden Enzymen nicht möglich ist, wenn im Substrat neben Acetaldehyd auch Äthanol vorhanden ist.

Anschließend wurde ein Rheingauer Wein auf seinen Gehalt an Acetaldehyd untersucht. Bei der Bestimmung wurde eine Extinktion von 0,25 gemessen, was einem Acetaldehydgehalt von 38 mg/l entspricht. Dieser Wein wurde neben der beschriebenen Modelllösung zum Test der Enzymlösungen auf ihre Aktivität benutzt. Außerdem wurde eine Modelllösung hergestellt, die lediglich Wasser und Acetaldehyd enthielt, der an SO_2 gebunden war.

Das Enzym kam vollkommen ungereinigt, d. h. zusammen mit den zerstörten und unzerstörten Zellen und dem Zerkleinerungsmaterial - in diesem Falle gereinigter Sand - in den Wein oder in die entsprechende Lösung und blieb 15 Stunden zur Reaktion stehen. Die Menge an Wein betrug jeweils 25 ml, der Zusatz an Puffer-Hefegemisch in jedem Falle 10 ml. Als Vergleichslösungen dienten ein Ansatz, der mit 10 ml destilliertem Wasser verdünnt worden war und ein zweiter, dem 10 ml einer Gelatinelösung zugesetzt worden waren. In Tabelle 21 ist das Ergebnis dieser Versuchsreihe wiedergegeben.

Tabelle 21

Einfluß eines Hefe-Macerates auf den Aldehydgehalt
von Wein und den einer Modelllösung

T a b e l l e 20

Einfluss eines Enzymes aus *Glucor racemosus* auf den Acetaldehydgehalt eines

alkoholhaltigen Modellweines

Nr.	Substrat-Variante	Enzymzugabe in ml	Extinktion
1	Modellwein ohne SO_2	-	0,565
2	Modellwein ohne SO_2	1,5	0,57
3	Modellwein ohne SO_2	1,5 + NAD	0,52
4	Modellwein mit SO_2	-	0,92
5	Modellwein mit SO_2	1,5	0,9
6	Modellwein mit SO_2	1,5 + NAD	0,9

T a b e l l e 21

Einfluß eines Hefe-Macerates auf den Acetaldehydgehalt von Wein und den einer Modelllösung

Nr.	Substrat	Macerat	Extinktion
1	Natur-Wein	-	0,167
2	Natur-Wein	Bierhefe-Macerat	0,175
3	Natur-Wein	Bäckerhefe-Macerat	0,13
4	Natur-Wein	Bierhefe-Macerat + NAD	0,165
5	Natur-Wein	Bäckerhefe-Macerat + NAD	0,135
6	Natur-Wein	Gelatinelösung	0,175
7	Modelllösung pH 7	Bäckerhefe-Macerat	0,02
8	Modelllösung pH 7	-	0,17

Die Tabelle zeigt, daß der Acetaldehyd in der Probe, die auf einen pH-Wert von 7 eingestellt worden war und keinen Alkohol enthielt, mit Hilfe eines Bäckerhefe Macerates nach 24 Stunden vollkommen abgebaut worden war. In den Natur-Wein-Proben dagegen schien der Acetaldehydgehalt eher einen geringen Anstieg zu zeigen.

Dieses Ergebnis macht wieder deutlich, daß es möglich ist, mit Enzymen aus Hefe den Acetaldehyd in einer neutralen und alkohol-freien Lösung abzubauen; auch in schwach sauren Lösungen geht ein solcher Abbau vor sich, wenn auch wesentlich langsamer. Er gelingt aber nicht in Wein, der Alkohol enthält und sauer ist.

Einfluß von Weininhaltstoffen auf die Aktivität acetaldehyd-abbauender Fermente.

Weitere Versuche mit Naturwein und Mucor-Macerat deuteten darauf hin, daß auch Mucor racemosus eher den Weinalkohol zu Acetaldehyd abbaut als Acetaldehyd zu Alkohol oder Essigsäure. Nach der Reaktion des Weines mit den Mucor-Macerat schien der Acetaldehydgehalt erhöht zu sein. Diese Beobachtungen sollten erneut untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine Modelllösung mit organischen Säuren aber ohne Äthanol hergestellt. Zum Vergleich diente eine Lösung mit Alkohol. Zu je 25 ml der Lösungen kam Mucor-Macerat hinzu. Außerdem wurde eine Probe zusätzlich mit ADH und NAD versetzt. Die Ergebnisse der Versuche mit diesen Modelllösungen sind in Tabelle 22 wiedergegeben.

Tabelle 22

Einfluß eines Mucor racemosus - Macerates auf den
Acetaldehyd- und Äthanolgehalt einer Modelllösung

Wie die Tabelle zeigt, hat die Lösung mit Äthanol tatsächlich einen erhöhten Acetaldehydgehalt, der verschiedene Ursachen haben kann. Der Acetaldehyd wurde entweder von dem in Mucor befindlichen Enzym neu gebildet oder ist mit dem Alkohol in die Lösung gekommen. Der mit Mucor durchgeführte Versuch wurde mit Aspergillus niger wiederholt.

Tabelle 22

Einfluß eines *Mucor racemosus* - Macerates auf den Acetaldehyd- und Äthanolgehalt

einer Modelllösung

Nr.	Äthanol	ADH in ml	Macerat	NAD in mg	Extinktion
1	-	0,08	Mucor	20	0,19
2	-	-	Mucor	-	0,17
3	10 %	-	Mucor	-	0,38
4	-	-	-	-	0,17

4.2.6. Enzym aus *Aspergillus niger*

Die entsprechenden Versuche mit Macerat von *Aspergillus niger* sind in Tabelle 23 wiedergegeben.

Tabelle 23

Einfluß eines *Aspergillus niger* Macerates auf den Acetaldehyd- und Äthanolgehalt einer Modelllösung

Die Tabelle zeigt, daß auch *Aspergillus niger* ein Enzym enthält, welches Acetaldehyd aus Alkohol neu bildet oder daß andererseits Alkohol die Aktivität des Aldehyd abbauenden Enzyms hemmt. Die Vergleichslösung Nr. 4 hat einen relativ hohen Acetaldehydgehalt weil sie unverdünnt geblieben ist.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde bei den nächsten Versuchen eine Modelllösung ohne Alkohol benutzt. Der Abbau von Acetaldehyd war jeweils nach ca. 20 Std. gut festzustellen. Da das Macerat eine starke Trübung verursachte und die Verdünnung nur schlecht einzustellen war, wurde zum Vergleich eine Probe mit Macerat versetzt, das 5 Minuten bei 100° C gehalten worden war und der Acetaldehydgehalt darin gemessen. Einige Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 24 wiedergegeben.

Tabelle 24

Einfluß eines *Aspergillus niger* Macerates auf den Acetaldehydgehalt einer Modelllösung

Dieser Tabelle ist zu entnehmen, daß der absolut höchste Acetaldehydgehalt in der Vergleichslösung gemessen wurde, da sie nicht verdünnt worden war. Die Probe, der 5 Minuten auf 100° C erhitztes Macerat zugesetzt worden war, hatte die zweithöchste Extinktion und ist als Vergleichslösung für die zwei anderen Proben zu werten, da die Aktivität der Enzyme nach Erhitzung auf 100° C für 5 Min. zerstört ist. Probe Nr. 1 zeigt nach 1 Tag ca. 28 % Abnahme, die Probe, die im Kühlschrank gelagert worden war,

Tabelle 23

Einfluß eines *Aspergillus niger* Macerates auf den Acetaldehyd- und Äthanolgehalt

einer Modelllösung

Nr.	pH	H ₂ O ml	Äthanol in ml	NAD mg	ADH ml	Extinktion
1	4	2,5	-	20	0,08	0,2
2	4	2,5	-	-	-	0,19
3	4	-	2,5	-	-	0,24
4	4	-	-	-	-	0,31

T a b e l l e 24

Einfluss eines Aspergillus niger Macerates auf den Acetaldehydgehalt einer

Flodellösung

Nr.	Zustand des Macerats	Extinktion
1	im Mörser zerkleinert	0,29
2	zerkleinert und 5 Minuten auf 100° C erhitzt	0,4
3	Mycel 24 Std. im Kühlschrank gelagert und anschließend gemörser	0,21
4	Vergleich, ohne Macerat	0,49

Nr. 3, fast 50 %. Nach 3 Tagen hatte der Acetaldehydgehalt um 90 % abgenommen.

Um noch einmal den Einfluß des Pilzmacerates auf eine alkoholische Lösung zu prüfen, wurde eine Modelllösung ohne Acetaldehyd mit 20 % Äthanol absolut versetzt. Die Lösung war auf einen pH-Wert von 3,1 eingestellt worden. Das Ergebnis ist in Tabelle 25 wiedergegeben.

Tabelle 25

Einfluß von Mucor- und Aspergillus-Macerat auf den
Äthanolgehalt einer acetaldehydfreien Modelllösung

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß sowohl zerkleinertes Pilzmycel als auch mehr oder weniger gut zerstörte Hefezellen in der Lage sind, Alkohol zu Acetaldehyd abzubauen. Die absolut größte Menge an Acetaldehyd wurde von Aspergillus niger Macerat geliefert. Mucor und Bäckerhefe haben fast die gleiche Leistung. Dabei spielt es keine Rolle, ob der Pilz auf normalem Apfelsaft gezogen wurde oder auf solchem, der vorher mit Acetaldehyd und SO_2 versetzt wurde. Das Ergebnis steht ganz im Einklang mit den Aussagen von KIELHÖFER und WÜRDIG (52), die eine Erhöhung des Acetaldehydgehaltes nach der Gärung unter aeroben Verhältnissen feststellten. Diese Zunahme ging andererseits mit einer Abnahme von Äthanol einher.

Einfluß von Bäckerhefe Macerat und Apiculatus Klöckera in verschiedenen Altersstadien.

Die Tatsache, daß frische Bäckerhefe in den anfänglichen Versuchen ihre Enzymaktivität bei einer geringeren H^+ -Ionenkonzentration einstellte als alte Bäckerhefe, veranlaßte uns vergleichende Versuche mit frischer und im Kühlschrank gelagerter Bäckerhefe durchzuführen. Der pH-Wert der Modelllösung war wie bei allen anderen Versuchen auf 3,1 eingestellt worden. Um neben Bäckerhefe eine andere Hefe auf Enzymaktivität zu untersuchen, wurde auch eine Probe mit Apiculatus Klöckera angesetzt. Es sollte hierbei nur festgestellt werden, ob die Enzyme verschiedener

Einfluß von Mucor- und Aspergillus niger-Macerat auf den Methanolgehalt einer
einer acetaldehydreichen Modelllösung

Nr.	Macerat	Zucht-Nährlösung	Extinktion
1	Mucor	Apfelsaft + SO ₂ + Acetaldehyd	0,165
2	Mucor	Apfelsaft unbehandelt	0,165
3	Asperg.n.	Apfelsaft unbehandelt	0,325
4	Bäckerhefe gekaut	Apfelsaft unbehandelt	0,16
5	—	—	0,005

Herkunft in der Lage sind, Acetaldehyd in saurer Lösung abzubauen. Die Modelllösung enthielt in diesem Fall keinen Alkohol. Tabelle 26 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches.

Tabelle 26

Einfluß von verschiedenen Hefe-Maceraten auf den
Acetaldehydgehalt einer Modelllösung

Die Extinktionsmessung wurde nach Ablauf von 24 Stunden vorgenommen. Verglichen mit der auf 100° C erhitzten Probe beträgt die Acetaldehydabnahme in Probe Nr. 2 60 % während das Macerat der frischen Hefe lediglich eine Abnahme von 20 % bewirkte. Die Abnahme in Probe Nr. 1, der ein Macerat von Apiculatus Klöckera aus Äpfelwein zugegeben wurde, war noch geringer. Die Messung nach 2 Tagen brachte kaum eine Änderung der Ergebnisse. Der Acetaldehydgehalt hatte lediglich in der ersten Probe geringfügig zugenommen.

Dieselben Versuche wurden mit Mucor racemosus in verschiedenen Altersstadien durchgeführt. Nach einem Tag war die Abnahme an Acetaldehyd wesentlich geringer als bei den Versuchen mit Bäckerhefe. An den folgenden Tagen nahm der Acetaldehydgehalt aber auch in diesen Proben ständig ab.

Einfluß von Aspergillus niger Macerat in Abhängigkeit von pH und Temperatur.

Um nun noch vergleichende Zahlen für Aspergillus niger - Macerat zu erhalten, wurde ein neuer Versuch mit 10 Proben angesetzt, in denen der Einfluß des Aspergillus niger Macerates auf den Acetaldehydgehalt der Modelllösung in Abhängigkeit vom pH-Wert getestet wurde. Jedes der 50 ml Enghals-Erlenmeyer-Kölbchen enthielt 25 ml Modelllösung, 7 ml Puffer verschiedener Ionenstärke und 6,2 g gemörsertes Mycel. Der Acetaldehydgehalt wurde nach 24 Stunden chemisch bestimmt. Ein Teil der Kölbchen wurde bei Zimmertemperatur aufgestellt, ein anderer Teil bei 30° C. Die Aspergillus niger Kulturen waren 8 Tage alt; außer in

Einfluß von verschiedenen Hefe-Flacciditäten auf den Acetaldehydgehalt
einer Modelllösung

Nr.	Alter	Behandlung	Extinktion
1	Apiculatus Klöckera	gemörsert	0,36
2	Bäckerhefe gelagert	gemörsert	0,16
3	Bäckerhefe gelagert	gemörsert und auf 100° C	0,4
4	Bäckerhefe frisch	gemörsert	0,32
5	—	—	0,41

Probe 9; bei der nur 4 Tage altes Mycel zugesetzt wurde. Nachdem der Acetaldehydgehalt bestimmt worden war, wurden die Reste von je 2 Proben vermischt und darauf in der Mischung der pH-Wert festgestellt. Die Ergebnisse der doppelt durchgeführten Versuche sind in Tabelle 27 wiedergegeben.

Tabelle 27

Einfluß von Aspergillus niger Macerat auf den Acetaldehyd-
gehalt einer Modellösung - in Abhängigkeit vom pH-Wert und
von der Temperatur bei der Reaktion

Die Messung wurde nach 24 Stunden durchgeführt. Die in der Tabelle wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, daß der Acetaldehyd-gehalt in der Probe Nr. 6 um 55 % abgenommen hat. Sehr ähnlich sind die Verhältnisse in Probe Nr. 5. Beim Vergleich dieser zwei Proben mit den übrigen ist die Temperatur von 30° C und der pH-Wert von 3,5 für den Acetaldehydabbau im alkoholfreien Substrat günstiger, was auf die erhöhte Rest-Temperatur zurück-zuführen ist, als Zimmertemperatur und der pH-Wert von 3,1. Insgesamt ist festzuhalten, daß in Aspergillus niger ein Enzym enthalten sein muß, das bei einem niedrigen pH-Wert und Zimmer-temperatur Acetaldehyd abbaut.

Um den eventuellen Einfluß von lebenden Zellen und Sporen auf den Acetaldehydgehalt beurteilen zu können, blieben die Gefäße 26 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Proben Nr. 5 und 6, die die größte Acetaldehydabnahme nach einem Tag zu verzeichnen hatten, zeigten kein Wachstum an Aspergillus niger Mycel. Probe 3 und 4 sowie 7 und 8 zeigten sehr gutes Wachstum; 1 und 2 sehr wenig.

Einfluß des gefällten Enzyms in Abhängigkeit vom pH.

Nachdem die Versuche mit Aspergillus niger Macerat so positive Ergebnisse gezeigt hatten, sollten nun auch Untersuchungen mit einem gereinigten und spezifisch wirkenden Enzym durchgeführt werden.

Einfluß von Aspergillus niger Macerat auf den Acetaldehydgehalt einer Modelllösung
in Abhängigkeit vom pH-Wert und von der Temperatur bei der Reaktion

Nr.	Temperatur	pH	Zusatz ges. ing g	Putterzusatz in ml + H ₂ O	k _{Hyce} in g	Extinktion	Abnahme in %
1	Zimmer	3,5	14,5	5,5 + 1,5	6,2	0,24	36
2	Zimmer	3,5	14,5	5,5 + 1,5	6,2	0,24	36
3	Zimmer	3,1	11,9	7 ml H ₂ O	6,2	0,28	28
4	Zimmer	3,1	11,9	7 ml H ₂ O	6,2	0,28	28
5	30° C	3,5	16,0	7,0 ml Putter	6,2	0,19	50
6	30° C	3,5	16,0	7,0 ml Putter	6,2	0,18	55
7	auf 100° C für 7 Min.	3,9	15,0	7 ml Putter + 5 ml H ₂ O	6,2	0,38	0
8	auf 100° C für 7 Min.	3,9	15,0	7 ml Putter + 5 ml H ₂ O	6,2	0,38	0
9	Zimmer	3,45	-	7 ml Putter	6,2	0,29	ca 23
10	Zimmer	3,45	-	7 ml Putter	-	0,37	0

Wie bereits erwähnt besteht der erste Schritt zur Reinigung des Enzymes in einer Befreiung von Mycel- oder Zellresten. Dazu wird das Puffer-Zell-Gemisch bei 10.000 Upm abzentrifugiert und zum Teil anschließend noch filtriert. Danach wird das Enzym mit festem Ammoniumsulfat ausgefällt. Die Fällung bis zu 1,3 m wurde verworfen, während die von 1,3 bis 3,5 m das Enzym enthalten sollte. Auch in der Literatur ist Ammoniumsulfat als Eiweiß-fällungsmittel angegeben. Durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat lassen sich zwei Fraktionen unterscheiden: die Albumine, die selten aus halbgesättigten Ammoniumsulfat - Lösungen gefällt werden, aber in reinem Wasser löslich sind, und die Globuline, welche erst bei höheren Ammoniumsulfat-konzentrationen präzipitieren. Obwohl generell in der Literatur Ammoniumsulfat als Fällungsmittel für Sphäroproteine vorgeschlagen wird, gibt es unterschiedliche Aussagen darüber, was in welcher Fraktion fällt. Nach HOFMANN-OSTENHOF (36) fällt das Albumin aus einer halbgesättigten Lösung aus. BEYER (5) dagegen behauptet, daß Globulin aus einer halbgesättigten Lösung aus-falle und Albumin aus einer gesättigten Lösung.

Wie vorgeschlagen, wurde nun ein *Aspergillus niger* Macerat mit Sörensen Puffer (pH 7) gemörsert und anschließend zentrifugiert. Die überstehende Lösung, ein Protein-Puffer-Gemisch, wurde teilweise direkt zum Abbau von Acetaldehyd zur Modelllösung zugegeben und teilweise weiter verarbeitet. Die Messung des Aldehydgehaltes nach einem Tag wies auf einen Abbau hin (nach 4 Tagen 70 % Abnahme). Der Rest an Protein-Puffer-Lösung wurde mit Ammoniumsulfat versetzt (bis 1,3 m) und die Fällung abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut mit Ammoniumsulfat versetzt (bis 3,5 m) und blieb über Nacht im Kühlschrank stehen. Diese Fällung wurde abzentrifugiert und je 2 ml davon zu je 25 ml Modelllösung mit einem pH-Wert von 3 gegeben. Nach 4 Tagen hatte noch kein Acetaldehyd-Abbau stattgefunden. Um aber sicher zu gehen, daß dieses Ergebnis nicht auf eine Inaktivierung des Enzyms zurückzuführen ist, wurde eine Vergleichsprobe bei

pH-Wert 6 angesetzt. Die Aldehyd-Abnahme in dieser Probe betrug 100 %. Als Abbauprodukt kommt sowohl Äthanol als auch Essigsäure in Frage. Die Essigsäure-Bestimmung mit Acetat-Kinase ergab einen hohen Essigsäuregehalt. Es war mehr gebildet worden als sich theoretisch aus dem vorhandenen Acetaldehyd hätte herstellen lassen. Diese Beobachtung zeigt, daß noch andere Reaktionen mit im Spiel sind bei denen Essigsäure gebildet wird. Insgesamt liegt es aber nahe, daß *Aspergillus niger* eine Acetaldehyd-Dehydrogenase enthält, die aber bei einem pH-Wert 3 nicht mehr wirken kann. Im Macerat ist das Enzym wahrscheinlich noch von Schutzsubstanzen umgeben, die es vor dem direkten Einfluß der H^+ -Ionen schützen.

Um diese Aussage zu überprüfen, wurden weitere mit Ammoniumsulfat gefällte Enzympräparate hergestellt und ihre Aktivität bei verschiedenen H^+ -Ionenkonzentrationen gemessen. Ein Ergebnis ist in Abbildung 36 graphisch dargestellt. Da die übrigen Kurven ähnlichen Verlauf aufwiesen, wurde auf ihre Wiedergabe verzichtet.

Abbildung 36

Aktivität eines Enzymes aus *Aspergillus niger* in
Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration

Wie die Tabelle zeigt, hat der Acetaldehydgehalt beim pH-Wert 6 schon nach wenigen Stunden um 40 % abgenommen, während er bei pH 5 fast noch so hoch ist wie in der Vergleichslösung. Im zunehmend alkalischen Bereich sinkt die Aktivität ebenfalls ab.

Insgesamt gesehen lag das pH-Optimum aller hergestellten Aldehyd abbauenden Enzyme beim pH-Wert 6. Unterhalb des pH-Wertes 5 ist die Aktivität nur noch außerordentlich gering, sodaß beim pH-Wert 3 sehr hohe Enzymmengen eingesetzt werden müssen, um überhaupt noch einen Acetaldehydabbau zu erreichen.

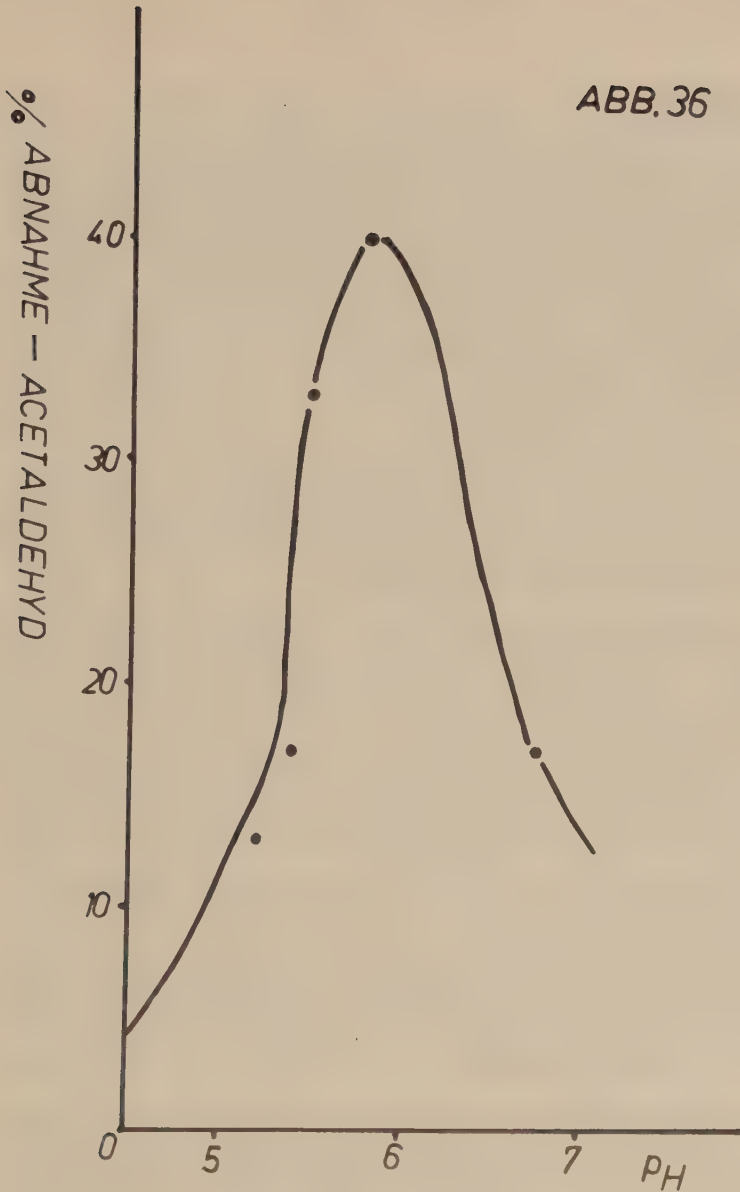


Abb. 36 Aktivität eines Enzyms aus *Aspergillus niger* in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration

5. Zusammenfassung

In einem Literaturüberblick werden zunächst Vorkommen, Anwendung und Bedenklichkeit der SO_2 sowie die Zusammenhänge zwischen Acetaldehyd und SO_2 -Bedarf eines Weines und ihr mengenmäßiges Vorkommen in Weinen aus verschiedenen Weinbaugebieten der Welt dargestellt. Dann wird die Acetaldehydbildung im Verlauf der alkoholischen Gärung und deren Abhängigkeit von verschiedenen kellertechnischen Faktoren, vom Substrat und den Gärbedingungen diskutiert.

Eigene Versuche beschäftigen sich mit dem Ablauf der Gärung im Hinblick auf die Bildung von Nebenprodukten in Abhängigkeit von Polyphenolen, von der Wasserstoffionenkonzentration, von Vitaminzusätzen und Stickstoffquellen.

Die Gärung wurde mit den Kulturhefen "Geisenheim 1949" und "Geisenheim 1933" sowohl in dem natürlichen Substrat Traubenmost, als auch in synthetischen Medien durchgeführt. Dabei wurden gebildetes Kohlendioxyd, Äthanol, Acetat, Pyruvat und Acetaldehyd quantitativ bestimmt. Im Verlauf der Untersuchungen kommen die Vor- und Nachteile der einzelnen Bestimmungsmethoden sowie die Aussagekraft der Metabolitenkurven zur Diskussion.

Im einzelnen wurde festgestellt, daß die Polyphenole des Substrates keinen grundsätzlichen Einfluß auf den Gärverlauf haben. Es war lediglich eine gewisse Tendenz der Gärhemmung zu Beginn der alkoholischen Gärung festzustellen. Der Äthanol-, Acetaldehyd- und Pyruvatgehalt wurde durch die Polyphenole jedenfalls nicht beeinflusst.

Einen völlig anderen Verlauf nimmt die Gärung in einem vollsynthetischen, wuchsstofffreien Medium: Sie geht wesentlich langsamer vor sich und die Alkoholbildung erfolgt linear. Bei der Vergärung eines vollsynthetischen Substrates bildet sich etwa genausoviel Acetaldehyd wie in einem natürlichen Substrat; jener wird aber nicht in der Phase der stürmischen Gärung

abgebaut, sondern nimmt ähnlich wie der Alkohol gleichmäßig zu; er bleibt im Gegensatz zum natürlichen Substrat auf der Höhe, die maximal bei der Gärung gebildet wurde. Auch die am Ende der Gärung vorliegenden Pyruvatmengen unterscheiden sich wesentlich von denen, die im Verlauf der Gärung eines natürlichen Substrates gebildet werden: Nach der Vergärung eines synthetischen Mediums liegen etwa drei mal so große Mengen vor wie bei der Vergärung eines biologischen Materials.

Eine Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration beeinflusst den Gärverlauf eines synthetischen Mediums in der Weise, daß die an sich schon gehemmte Gärung noch weiter verzögert wird. Bei den Versuchen wurde in einem synthetischen Gärsubstrat, bei einem pH-Wert von 2,75 im Verlauf von 30 Tagen nur 45 g/l Alkohol gebildet; bei weniger sauren Nährmedien hatten sich innerhalb dieses Zeitraumes im Mittel 76 g/l gebildet. Entsprechend der verzögerten Äthanolbildung erreichte der Acetaldehyd nach diesem Zeitraum erst sein Maximum, das sich aber in der Höhe von den anderen Proben kaum unterschied.

Die hohe Pyruvatkonzentration wies auf einen Wuchsstoffmangel hin. Daraufhin wurde die Bedeutung der Vitaminierung im Vermehrungs-, Atmungs- und Gärungsstoffwechsel erläutert. Aufgrund der Einflüsse, die Vitamine generell auf den Stoffwechsel haben, wurden weitere Versuche mit vitaminisierten Substraten durchgeführt. Eine Wuchsstoffzugabe beeinflusste die Gärung in ähnlicher Weise, wie sie auch bei biologischen Substraten bekannt ist. Die Konzentrationen und das Verhalten der einzelnen untersuchten Metaboliten deuten auf eine Aktivierung der Gärung mittels Wuchsstoffen hin.

Weitere Versuche, die mit vitaminisierten Substraten auch in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration durchgeführt wurden, zeigten, daß die Gärung in einem wuchsstoffhaltigen Substrat weniger durch eine Senkung der Wasserstoffionenkonzentration beeinflusst wird als im vitaminfreien.

Die Zugabe von Wuchsstoffen beeinflusste auch die Bildung von Gärungsnebenprodukten: Im Gegensatz zur Gärung in einem vitaminfreien Substrat wurde Acetaldehyd in der Phase der Hauptgärung zum großen Teil abgebaut; die Acetaldehydzu- und Abnahme verlief nun wieder wie bei der Vergärung eines biologischen Substrates. Ähnlich verhielt sich die Pyruvatbildung: Durch die Zugabe von Vitaminen kam es nicht zum Pyruvatstau, größenordnungsmäßig wurden nur Mengen gebildet, wie sie auch bei der Vergärung von natürlichen Substraten beobachtet wurden.

Die Vitaminierung mit komplexen Wuchsstoffgaben sagte jedoch nichts darüber aus, ob der Acetaldehydabbau in der Phase der Hauptgärung vom Vorhandensein oder Fehlen eines bestimmten Vitamines abhängig ist, oder ob verschiedene Vitamine in Kombination vorhanden sein müssen.

Die angestellten Versuche mit einzelnen Vitaminen zeigten, daß vor allem dem Na-Salz der Pantothensäure und in geringerem Umfang Thiamin für den Abbau des Acetaldehyds eine entscheidende Bedeutung zukommt.

Für den Pyruvatabbau spielt Thiamin eine eindeutig essentielle Rolle. Fehlt dieses Vitamin so werden im synthetischen Medium Mengen von 200 bis 300 mg/l, Pyruvat gebildet, ist es vorhanden so entstehen nur 0 bis 20 mg/l.

Außer der Wirkung von Vitamingaben auf die Bildung von Acetaldehyd wurde auch der Einfluß verschiedener Stickstoffquellen auf dessen mengenmäßiges Vorkommen im Verlauf der Gärung geprüft. N-Quellen wie sie sich im Hefe-Extrakt finden in Kombination mit Vitaminen führten dazu, daß am Ende der Gärung verhältnismäßig niedrige Acetaldehydmengen vorhanden waren; ließ man Hefe und Substrat zusammen, so kam es danach wieder zu einer erheblichen Neubildung von Acetaldehyd, die auf die Fortführung des Stoffwechsels der Hefen zurückzuführen ist. Durch eine Unterbrechung dieser Tätigkeit nach bereits abgeschlossener Gärung kann man die Neubildung verhindern.

Abschließend läßt sich sagen, daß in einem nährstoffreichen Substrat solche Enzymsysteme der Hefe aktiviert werden, die für einen relativ niedrigen Acetaldehyd- und Pyruvatgehalt am Ende der Gärung verantwortlich und entscheidend sind. Die Hefe braucht wie alle anderen Lebewesen ein ausgeglichenes Nahrungsangebot wenn man erreichen will, daß möglichst wenig Gärungsnebenprodukte anfallen.

Diese Beobachtungen erklären nun auch den unterschiedlichen SO_2 -Bedarf der Weine aus den verschiedenen Weinbauländern der Welt:

Stehen für die Weingewinnung Moste aus gut gereiften, vitaminhaltigen Trauben zur Verfügung, so erhält die Hefe im Hinblick auf eine möglichst quantitative Alkoholausbeute aus dem vorhandenen Zucker ein ausreichendes Angebot an Nährstoffen, und es werden relativ geringe Mengen an Acetaldehyd und Pyruvat gebildet, die einen niedrigen SO_2 -Bedarf bedingen. Können die Trauben nur mangelhaft ausreifen, wie es in den nördlichen Weinbaugebieten häufig der Fall ist, so wird die Hefe nur mangelhaft mit Wuchsstoffen versorgt.

Infolgedessen kommt es zum Stau von Pyruvat und Acetaldehyd. Diese beiden Substanzen müssen durch SO_2 gebunden werden, sodaß Weine aus unreifen Trauben einen erhöhten SO_2 -Bedarf haben.

Die Versuche hatten gezeigt, daß der Verbleib großer Mengen nicht abgebauten Acetaldehyds und Pyruvats am Ende der Gärung auf ein mangelndes Gleichgewicht in den Stoffwechselabläufen zurückzuführen ist. Aus diesem Grunde wurde versucht, wenigstens den Acetaldehyd mit Fermenten abzubauen, die aus Mikroorganismen gewonnen wurden. Es wurde zunächst eine Aldehyd-Dehydrogenase aus Bäckerhefe gewonnen und auf ihre Fähigkeit zum Acetaldehydabbau beim pH des Weines untersucht. Obwohl es ohne Schwierigkeiten gelang ein Enzympräparat herzustellen, das Acetaldehyd in einer neutralen, alkoholfreien Lösung abbauen konnte, war es nicht möglich mit diesem

Präparat in alkoholhaltigen sauren Modellösungen oder auch in Weinen einen Abbau des Acetaldehyds zu erreichen. Auch Versuche Mikroorganismen mit gewünschten Eigenschaften und Enzymen - nämlich acetaldehydabbauenden - zu züchten, schlugen fehl. Es war nicht möglich, aus dem auf acetaldehydhaltigem Apfelsaft gezüchteten *Mucor racemosus* Enzyme zu gewinnen, die in alkoholischen sauren Lösungen Acetaldehyd in Essigsäure umwandeln konnten worauf Vorversuche hingedeutet hatten. Schließlich wurde in der gleichen Weise auch *Aspergillus niger* vermehrt. Auch aus seiner Zellsubstanz konnten Fermente isoliert werden, die im pH-Bereich um 6 Acetaldehyd abbauen konnten. Es gelang aber auch hier nicht mit diesen Fermenten Acetaldehyd bei einem pH-Wert wie er auch im Wein vorkommt in alkoholischen Substraten abzubauen. In weiteren Versuchen wurden die Fermente aus den einzelnen Mikroorganismen gereinigt. Es zeigte sich aber auch hier immer wieder, daß ihr Optimum etwa beim pH-Wert 6 lag, und daß beim pH-Wert 3 keine Aktivität mehr festgestellt werden konnte.

Insgesamt zeigen die Versuche für die Praxis, daß der SO_2 -Bedarf von Weinen im wesentlichen vom Reifegrad der Trauben, aus denen er gewonnen wurde, abhängig ist:

Nur ausgereifte Trauben sichern der Hefe ein Nährstoffangebot, welches das nötige Gleichgewicht in den Stoffwechselabläufen sichert, während die Gärung in Maischen aus nicht ausgereiftem Traubenmaterial einen Acetaldehyd- und Pyruvatstau bewirkt.

Summary

In a brief look at the available literature, occurrence, use and toxicity of SO_2 are presented together with the relationship of acetaldehyde and the SO_2 requirement of wine and its quantitative occurrence in wine from different wine-growing areas of the world. The formation of acetaldehyde during the alcoholic fermentation and its dependence on various techniques used in the production of the wine and on the substrate and conditions of fermentation are then discussed.

Experiments done for this paper deal with how fermentation proceeds in connection with the production of side products, dependent on the polyphenols present, the concentration of hydrogen ions, the vitamin additives and the source of nitrogen.

The fermentation was carried out with the cultured yeast "Geisenheim 1949" and "Geisenheim 1933" on the natural substrate grape juice as well as on synthetic media. The amounts of carbon-dioxide, ethanol, acetate, pyruvate and acetaldehyde formed during the process were quantitatively analysed. In the course of the experiments the advantages and disadvantages of the individual analytical methods used as well as the usefulness of metabolic graphs were determined.

It was established that the polyphenols of the substrate have no basic influence on the fermentation process. Only a certain tendency to inhibit the fermentation could be noticed at the beginning of the alcoholic fermentation. The amount of ethanol, acetaldehyde and pyruvate was not influenced by the polyphenols.

The fermentation takes a completely different course when occurring in a fully synthetic medium free from nutritional substance: it occurs significantly slower and the alcohol production linearly follows the rate of the fermentation. Approximately the same amount of acetaldehyde is accumulated by the fermentation of a fully synthetic substrate as with a natural one; it is not decomposed in the phase of violent

fermentation, however, but increases proportionally similar to the alcohol. In contrast to the natural substrate it remains at its maximal level reached during the fermentation. Similarly, the amount of pyruvate present at the end of the fermentation is substantially different from that which is formed during the course of fermentation of natural substrates: after the fermentation of a synthetic medium approximately three times as much pyruvate is present as with a biological material.

An increase in the concentration of hydrogen ions influences the course of fermentation of a synthetical medium in that the fermentation, which is of itself inhibited, is retarded further. In the experiments in the course of thirty days only 45 grams per liter of alcohol were formed in a synthetic fermenting substrate in a pH of 2.75; by less acetic nutrient bases under otherwise similar conditions 76 g/l were formed. Corresponding to the retarded ethanol formation, only after this period of time the acetaldehyde reached its maximum, which showed an insignificant difference in volume compared to the other experiments.

The high concentration of pyruvate pointed to a deficiency of nutritional substance. On this basis, the meaning of the vitaminization in the metabolism of reproduction, respiration and fermentation was explained. On the basis of the influence which the vitamins in general have on the metabolism, further experiments were conducted. An increase in growth substance influenced the fermentation in a similar manner with regard to its action with biological substrate. The concentrations and the behavior of the individually examined metabolites point to activation of fermentation by means of growth substances.

Further experiments, carried out on vitamized substrates, also dependent on hydrogen ion concentration, showed that fermentation is less influenced by a decline in the concentration of H-ions in a nutritionally adequate substrate than in one free from vitamins. The supplement of nutritional material also affected the formation of by-products of the fermentation: in contrast

to fermentation in a vitamin free substrate, acetaldehyde concentration is largely decreased in the main fermentation stage; the acetaldehyde increase and decrease then again ran as with the fermentation of a biological substrate. Pyruvate formation followed a similar pattern: an impounding did not occur because of the vitamin supplements. Comparing quantities, the amounts were similar to those formed by fermentation of natural substrates.

The vitaminization with complex nutrient supplements does not necessarily prove that the reduction of acetaldehyde in the main fermentation phase is dependent on the presence or lack of a certain vitamin, or that various vitamins in combination must be present.

The experiments made with individual vitamins showed that of decisive significance in the decrease of the acetaldehyde is first of all the Na-salt of pantothenic acid and to a lesser extent thiamine. Thiamine clearly plays an essential part in the pyruvate reduction: if this vitamin is lacking, in synthetic medium 200-300 mg/l of pyruvate are formed; when it is present, only 0-20 mg/l appear.

Along with the effect of vitamin dosages on acetaldehyde formation, the influence of various sources of nitrogen on its quantitative occurrence during the course of fermentation was tested. Nitrogen sources as they occur in yeast extract together with vitamins led to a result of relatively low quantities of acetaldehyde after the final stage of fermentation. However, when the yeast and substrate were left together, there again resulted a considerable new formation of acetaldehyde, which can be traced back to the continuation of the metabolism of the yeast. This new formation can be hindered by interrupting this activity after the fermentation is completed.

In closing, it can be said that in a substrate rich in nutrient material, enzyme systems in the yeast will be activated, which are responsible for a relatively low acetaldehyde and pyruvate content when fermentation has taken place. As do all other

living beings, yeast needs a balanced nutritional supply if as few fermentation by-products as possible are to result.

These observations also explain the different SO_2 need of wines from various wine growing countries of the world. If juices from well-ripened grapes containing vitamins are at one's disposal for the wine production, the yeast contains a sufficient supply of nutrients with regard to as quantitative an alcohol yield as possible from the sugar which is present, and there will be relatively small quantities of acetaldehyde and pyruvate formed, which results in a low SO_2 requirement. If the grapes cannot fully ripen, as it is often the case in northern wine-growing areas, then the supply of growth substances for the yeast will be deficient. As a result of this pyruvate and acetaldehyde production is inhibited. Both of these substances are related to SO_2 demand, so that wine from unripened grapes has a higher SO_2 need.

The experiments have shown that the storage of large quantities of acetaldehyde and pyruvate which had not been reduced at the end of fermentation could be traced back to a deficient balance in metabolism completion. For this reason it was attempted to reduce the acetaldehyde with ferments which had been acquired from microorganisms. First an aldehyde-dehydrogenase was prepared from baker's yeast and was examined as to its capability for reduction of the acetaldehyde by the pH of the wine. Although producing an enzyme preparation which could reduce acetaldehyde in a neutral alcohol-free solution was accomplished with no problems, it was not possible to obtain the reduction of the acetaldehyde in alcohol-containing acetic test solutions or in wine with this preparation. Nor did attempts to culture microorganisms with desired properties and enzymes (specifically, those which would reduce acetaldehyde) succeed. It was not possible to get enzymes from "mucor racemosus" cultivated on apple juice containing acetaldehyde, which could have converted acetaldehyde to acetic acid in alcoholic acetic solutions as preliminary experiments had intimated.

Finally, *Aspergillus niger* molds were propagated in the same way. Enzymes could also be isolated from its cell substance which could reduce acetaldehyde at about a pH of 6. But here again there was no success when using these enzymes in alcoholic substrates to reduce acetaldehyde with a pH value as it occurs in wine. In further experiments the enzymes from the various microorganisms were cleaned, but again the conclusion reached showed that their optimum activity occurred at a pH of 6, and that by pH 3 no further activity could be determined.

In general, the experiments show that the SO_2 supply of wines is dependent essentially on the degree of maturity of the grapes from which it was extracted. Only fully matured grapes assure the yeast of a nutritional supply, which ensure the necessary balance in the metabolism completion, while the fermentation in mashing from grape material not completely ripened causes an inhibition in the formation of acetaldehyde and pyruvate.

Literaturverzeichnis

1. AMERINE, M.A. u. C.S. OUGH: Studies on controlled fermentations III. Am.J.Enol., 8, (1957) 18-30
2. AMERINE, M.A. u. C. S. OUGH: Studies on controlled fermentations VIII. Factors affecting aldehyde accumulation. Am.J.Enol., 15, (1964) 23-33
3. BÄRWALD, G.: Über den Aldehydgehalt des Bieres. Tagesztg. Brauerei, 62, (1965) 896
4. BAVISOTTO, V.S., ROCH, L.A. u. B. HEINISCH: Gaschromatography of volatiles in beer during its brewing, fermentation and storage I, II u. III. Amer.Soc.Brew.Chem., Proc. (1959) 63-75
5. BEYER, H.: Lehrbuch der organischen Chemie, 11/12 Aufl. S. Hirzel Vlg, Leipzig (1966) S. 732
6. BLOUIN, J.: Contribution à l'étude des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les mûts et les vins. Ann.Technol.Agr., 15 (1966) 223-287, 359-401
7. BÖHRINGER, Mannheim: Vorschriften zur enzymatischen Analyse
8. BURGER, M., GLENISTER, P.R. u. K. BECKER: Acrolein and other aldehydes in beer. Amer.Soc.Brew.Chem., Proc. (1954) 98-107
9. BURKHOLDER, P.R., Mc VEIGH, J. u. D. MOYER: Studies on some growth factors of yeasts. J. Bact., 48, (1944) 385
10. CANTARELLI, C.: On the activation of alcoholic fermentation in wine making. Am. J. Enol., 8, (1957) 113-120, 167-175

11. CARLSON, G.L. u. G.M. BROWN: The natural occurrence and enzymatic formation of a hydroxyethyl derivative of thiamine pyrophosphate. *J. biol.chem.*, 235, (1960) 3-4
12. CHERNOKAN, V.F.: Effect of grape juice containing sulfur dioxide on animals. *Zdravookhranenie*, 12, (1969) 7-9, Ref.: *Ca.* 73 (1970) 1413
13. CONWAY, E.J. u. M. DOWNEY: pH values of the yeast cell. *Biochem.J.*, 47 (1950) 355-360
14. COWLAND, T.W.: Some effects of aeration on the continous fermentation of hopped wort. *J. Inst. Brew.*, 73, (1967) 542-551
15. CREMER, H.D. u. D. HÖTZEL: Thiamin-Sulfit-Antagonismus in vivo eine Antithiaminwirkung. *Nutritio et Dieta*, 8, (1966) 126-138
16. CREMER, H.D. u. D. HÖTZEL: Thiaminmangel und Unbedenklichkeit von Sulfit für den Menschen. *Internat. Z. Vit. Forsch.*, 40, (1970) 52
17. CROWTHER, R.F. u. J.H.L. TRUSCOTT: The use of agitation in the making of flor type sherry. *Am.J.Enol.*, 8, (1957) 11-17
18. CROWTHER, R.F. u. J.H.L. TRUSCOTT: Flor type Canadian sherry wine. Report of the Hort. Exp.Sta. and Prod.Lab., Vineland, Ontario, Canada (1955/56) 72-83
19. DIEMAIR, W.: Funktion und Schicksal der schwefeligen Säure in Lebensmitteln. *Die Ernährungswirtsch.*, 10, (1963) 666-668
20. DITTRICH, H.H.: Bakterien im Wein. *Deutscher Weinbau Kalender*, 16, (1965) 150-154

21. DITTRICH, H.H. u. TH. STAUDENMAYER:
Die Acetaldehydbildung bei der Mostver-
gärung und bei der Süßreservebereitung.
Weinwiss., 23, (1968) 1-7
22. DITTRICH, H.H. u. S. GONGSAKDI: Umkehrung
des Brenztraubensäure/Acetaldehyd Verhältnisses
bei der Vergärung von Traubenmost in Abhängig-
keit von der Zuckerkonzentration.
ZUL, 139, (1969) 345-348
23. DITTRICH, H.H.: Untersuchungen zur Synthese
der Brenztraubensäuredecarboxylase bei Hefe.
Arch. Mikrobiol., 64, (1969) 223-228
24. DITTRICH, H.H.: Neuere Ergebnisse zur Bildung
von Acetaldehyd, Brenztraubensäure und
Ketoglutarsäure bei der Gärung.
11. Arbeitstagung des Forschungsrings des
Deutschen Weinbaus bei der DLG am 21.4. -
23.4.71 in Geisenheim
25. DREWS, B. u. G. BÄRWALD: Die höheren aliphati-
schen Alkohole im Bier.
Tagesztg. Brauerei, 62, (1965) 181
26. EMEIS, C.C.: Performance and stability of culture
yeast. Techn.Quart.MBAA., 3, (1966) 265-267
27. FITZHUGH, O.G., L.F. KNUDSEN u. A.A. NELSON:
The chronic toxicity of sulfites. J. Pharmacol.
86, (1946) 37
28. FORNACHON, J.C.M.: The accumulation of acetalde-
hyde by suspensions of yeasts. Aust.J.Biol.Sci.,
6, (1953) 222-233
29. Gesetz über Wein, Dessertwein, vom
16. Juli 1969 BGB I, S. 781 § 7 Abs. 4 (1,2,3)

30. GOTTSCHALK, A.: The mechanism of the pasteur effect in alcoholic fermentation by yeast cells. Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci., 19, (1941) 211-229
31. GOTTSCHALK, A.: The chemical equations of the phytochemical reductions by fermenting yeast cells and their relationship to the pasteur effect. Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci., 20, (1942) 173-185
32. HEINTZE, K.: Das Problem des Sulfitierens von getrockneten Gemüseprodukten einschließlich Kartoffeln im Rahmen der EWG. Dtsch. Lebensmittel-Rdsch., 60, (1964) 36
33. HENNIG, K.: Chemische Untersuchungsmethoden für Weinbereiter u. Süßmosthersteller 5. Aufl. Vlg. E. Ulmer, Stuttgart (1962) S. 16-20
34. HÖTZEL, D., E. MUSKAT u. H.-D. CREMER: Toxizität von schwefliger Säure in Abhängigkeit von Bindungsform und Thiaminversorgung. ZUL, 130, (1966) 25-31
35. HÖTZEL, D. u. MITARBEITER: Thiaminmangel und Unbedenklichkeit von Sulfit für den Menschen. Internat.Z.Vit.Forsch., 39, (1969) 372
36. HOFFMANN-OSTENHOF, O.: Enzymologie, Vlg. Springer, Wien (1954) S. 34
37. HOLZER, H. u. K. BEAUCAMP: Nachweis und Charakterisierung von α -Lactyl-Thiaminpyrophosphat (Aktives Pyruvat) und α -Hydroxyäthyl-Thiaminpyrophosphat (Aktiver Acetaldehyd) als Zwischenprodukte der Decarboxylierung von Pyruvat mit Pyruvatdecarboxylase aus Bierhefe Biochem.Biophys.Acta., 46, (1961) 225-243

38. HOLZER, H. u. K. BEAUCAMP: Nachweis und Charakterisierung von Zwischenprodukten der Decarboxylierung u. Oxydation von Pyruvat: "aktiviertes Pyruvat und aktivierter Acetaldehyd".
Angew.Chem., 71 (1959) 776
39. HOLZER, H. u. H.W. GOEDDE: Oxydation von α -Ketosäuren und einigen Aldehyden mit Pyruvat-decarboxylase aus Hefe.
Biochem. Z., 329 (1957) 192-208
40. HOLZER, H., G. SCHULTZ u. F. LYNEN:
Bestimmung des Quotienten DPNH/DPN in lebenden Hefezellen durch Analyse stationärer Alkohol u. Acetaldehyd Konzentrationen. Biochem.Z., 328 (1956) 252-263
41. HOLZER, H.: 4. Colloquium d. Gesellsch. f. Physiol. Chemie, zit.: Zwei Wege von Pyruvat zum Acetyl-Coenzym A in Hefe.
Biochem. Z., 329 (1957) 175-191
42. HOLZER, H., E. HOLZER u. G. SCHULTZ:
Zusammenhang zwischen Wachstum und aerober Gärung. Biochem. Z., 326 (1955) 385-404
43. HOLZER, H., J. WITT u. R. FREYTAG-HILF:
Zum Mechanismus des Pasteur-Effektes:
Bestimmung von ATP, ADP, Orthophosphat und verschiedenen Zwischenprodukten des Kohlenhydratstoffwechsels in lebenden Hefezellen beim Übergang von anaeroben zu aeroben Bedingungen. Biochem. Z., 329, (1958) 467-475
44. HOLZER, H., GOLDSCHMIDT, S., LAMPRECHT, W., u. E. HEIMREICH: Bestimmung stationärer Zwischenstoffkonzentrationen I. Bestimmung stationärer DPN/DPNH-Konzentrationen in lebenden Zellen u. Geweben. Z. Physiol.Chem., 297, (1954) 1-18

45. HOLZER, H., SCHULZ, G., C. VILLAR-PALASI
u. J. JÜNTGEN-SELL: Isolierung der Hefe-
carboxylase u. Untersuchungen über die
Aktivität des Enzyms in lebenden Zellen.
Biochem. Z., 327 (1956) 331-344
46. JOHNSON, G. u. D.K. JOHNSON: Natural
flavor retained in new frozen uncooked
apple pulp. Food. Technol., 6 (1952) 242
47. KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie,
Vlg. G. Thieme, Stuttgart, (1966) S. 240
48. KIELHÖFER, E. u. G. WÜRDIG: Die an Aldehyd
gebundene schweflige Säure im Wein.
Weinberg und Keller, 7, (1960) 16
49. KIELHÖFER, E.: Die Wirkung von schwefliger
Säure und von Ascorbinsäure auf die
organoleptischen Eigenschaften des Weines.
Weinberg und Keller, 5, (1958) 573-587
50. KIELHÖFER, E.: Die Bindung der schwefligen
Säure an Weinbestandteile.
Weinberg und Keller, 5, (1958) 461-476
51. KIELHÖFER, E. u. G. WÜRDIG: Der Verbrauch
von schwefliger Säure im Most u. Wein aus
gesunden und faulen Trauben.
Weinberg und Keller, 6, (1959) 364
52. KIELHÖFER, E. u. G. WÜRDIG: Die an Aldehyd
gebundene schweflige Säure im Wein.
Weinberg und Keller, 7, (1960) 50 - 61
53. KOCH, J.: Der Schwefelbedarf der Weißweine.
DWB, 13 (1955) 343 - 348
54. LAFON-LAFOURCADE, S. u. E. PEYNAUD: Sur
l'évolution des acides pyruvique et
cétoglutarique au cours de la fermentation
alcoolique. C.R.Acad.Sci.(Paris) 261 (1965) 1778-1780

55. LANG, K.: Die physiologischen Wirkungen von schwefliger Säure. Schriftenreihe d. Bundes f. Lebensmittelrecht u. Lebensmittelkunde 31, (1960) 7 - 16
56. LEHNINGER, A.L.: Bioenergetik Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1970) S. 68, 73
57. LEUCH, D.: Versuche zur Bestimmung der Schädlingsgrenze der in geschwefelten Weinen sich findenden schwefligen Säure. Correspondenzblatt f. Schweizer Ärzte, 25/19 (1895) 609 - 619
58. LOHMANN, K. u. P. SCHUSTER: Untersuchungen über die Cocarboxylase. Biochem. Z.: 294, (1937) 188
59. LUCHETTI, G. u. D. TRETTI: Hefen und pH-Wert. Tödliche Azidität, minimale u. optimale Azidität für die Entwicklung einiger Gattungen. Riv. Viticolt. Enol., 23 (1970) 95-102
60. LUTSDORF, U. u. R. MEGNET: Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Physiological control of ADH-2 and properties of ADH-2 and ADH-4 Arch. Biochem., 126, (1967) 194 - 201
61. LYNEN, F.: Über den aeroben Phosphatbedarf der Hefe Liebig's Ann., 544, (1941) 120
62. MANDL, B., F. WULLINGER, D. WAGNER, W. BINDER u. A. PIENDL: Zur Beurteilung der Biere nach dem Gehalt an Gärungsprodukten und Aminosäuren Brauwelt, 110 (1970) 1262
63. MANDL, B., WULLINGER, F., AWAN, J.A. u. A. PIENDL: Zur enzymatischen Kennzeichnung der Gärung der Hefe. Brauwiss., 23, (1970) 409 - 422

64. MEGNET, R.: Mutants partially deficient in Alcohol dehydrogenase in Schizosaccharomyces pompe.
Arch. Biochem., 121, (1967) 194-201
65. MÜLLER, G.: Diplomarbeit,
Über die Abhängigkeit des Histamin-
gehaltes der Weine von kellertechnischen
Maßnahmen (1969)
Aus dem Institut f. Ernährungswiss. I
an der Justus-Liebig-Universität, Gießen
66. NEGELEIN, E. u. H.J. WULFF:
Diphosphopyridinproteid, Alkohol,
Acetaldehyd. Biochem. Z., 293 (1937) 351-389
67. NORDSTRÖM, K.: Possible control of
volatile ester formation in brewing.
Eur. Brew. Conv. Proc., Stockholm
(1965) 195-208
68. NOVELLI, G.D. u. F. Lipmann:
The Involvement of Coenzyme A in
Acetate Oxidation in Yeast
J. biol. chem., 171, (1947) 833-834
69. OUGH, C.S. u. M.A. AMERINE:
Effects of temperature on wine making
Calif. Agr. Expt. Sta. Bull.,
827, (1966) 1 - 36
70. Ough, C.S. u. M.A. Amerine:
Studies with controlled fermentation X.
Effect of some volatile compounds in
wine.
Am. J. Enol. 18, (1967) 157-164
71. OUGH, C.S. u. M.A. AMERINE:
Studies on aldehyde production under
pressure, oxygen and agitation.
Amer. J. Enol., 9, (1958) 111-122

72. O'NEAL, R. u. W.V. CRUESS:
Clarification of wines and vinegars.
Wines and Vines, 32 (1951) 27 - 28
73. OURA, E. u. H. SUOMALAINEN:
Yeast carboxylase and cell permeability.
Acta chem. scand., 17 (1963) 885 - 886
74. PASTEUR, L.: Die Metallpufferfunktion
der Adonosinphosphate.
Bull. Soc.chim.biol. Paris (1861) 79 - 80
zit. nach RAAFLAUB, J.: Helv. Physiol. Acta
14, (1956) 304 - 318
75. PATSCHKY, A. u. H.J. SCHÖNE:
Beiträge zur Weinanalytik
Mitt. Klosterneuburg, 20 (1970) 432 - 445
76. PAUL, F.: Über den Acetaldehyd im Wein.
Mitt. Klosterneuburg, 8 (1958) 123 - 133
77. PAUL, F.: Schwefelungsversuche mit hochkurz-
erhitzten Traubenmosten und daraus erzeugten
Weinen.
Mitt. Klosterneuburg, 6, (1956) 34 - 48
78. PAUL, F.: Der Acetaldehyd als Ursache für
den Luftgeschmack eines Weines.
Mitt. Klosterneuburg, 8 (1958) 256 - 264
79. PAUL, F.: Funktionen der in der Kellerwirt-
schaft verwendeten Reduktionsmittel und
deren verfahrenstechnische Auswertung in der
Erzeugung österreichischer Weine.
Mitt. Klosterneuburg, 12 (1962) 275 - 287
80. PEYNAUD, E. u. S. LAFOURCADE:
Sur les conditions d'emploi de l'anhydride
sulfureux dans les vins liquoreux.
Bull.intern.vin., 252 (1952) 110

81. POMPEI, C.: Tési di laurea, I caratteri fermentativi degli stipiti selezionati di *Sacch. ellipsoideus*, *Sacch. oviformis*, *Sacch. pastorianus* e *Torulaspora rosei*: Indagine sperimentale. Università degli Studi di Perugia, Facolta di Agraria
82. RACKER, E.: Aldehyde dehydrogenase a diphosphopyridine nucleotide - linked enzyme *J.biol.chem.*, 177 (1949) 883
83. RANKINE, B.C.: Sulphur dioxide in wines *Food Technol.Austral.*, 18 (1966) 134 - 135, 137, 139, 141
84. RATNER, S., BLANCHARD, M., COBURN, A.F. u. D.E. GREEN: Isolation of a peptide of p-aminobenzoic acid from yeast. *J. biol. Chem.*, 155 (1944) 689
85. REBELEIN, H.: Beitrag zur Bestimmung und Beurteilung des Acetaldehyds bzw. der an Acetaldehyd gebundenen schwefligen Säure im Wein. *DLR*, 66 (1970) 6 - 11
86. REIFF, F., KAUTZMANN, R., LUERS, H. u. M. LINDEMANN: Die Hefen in der Wissenschaft, Bd. I, Vlg. H. Carl, Nürnberg (1960) S. 239
87. RIBÉREAU-GAYON, J. u. E. PEYNAUD: *Traité d'oenologie II: Caractères, transformations et traitements des vins.* eds. Ch. Béranger, Paris (1961)
88. RIBÉREAU-GAYON, J. u. Y. CHARPENTIER: *Expériences sur le sulfitage des moûts de raisins blancs.* *Ind. agric. alim.*, 66 (1949) 497
89. RUIZ-AMIL, M., FERNANDEZ, M.J., MEDRANO, L. u. M. LOSADA: Cellular distribution of yeast decarboxylase and its induction by glucose. *Arch. Mikrobiol.*, 55 (1966) 46 - 53

90. SAHONG CHO: Vergleichende Untersuchungen
über die Bildung von Gärungsnebenprodukten
durch Hefen.
Dissertation TH München, Fakultät für Brauwesen (1969)
91. SALLER, W.: Gärlenkung durch schweflige Säure.
Mitt. Klosterneuburg, 4 (1954) 197 - 212
92. SANDEGREN, E., GUTENBERG, H. u. L. ENEBO:
Untersuchung über die Stickstoffassimilation
der Brauereihefe unter Verwendung von Aminosäuren
mit radioaktivem Carboxylkohlenstoff.
Brauwiss., 8 (1955) 96
93. SCHANDERL, H.: Die schweflige Säure des Weines
in hygienischer Sicht., ZUL, 103 (1956) 379
94. SCHANDERL, H.: Handbuch der Kellerwirtschaft II.,
Vlg. E. Ulmer, Stuttgart (1959) S. 70 - 75
95. SCHMID, W.: Zellwachstum und Zellvermehrung
bei Hefe. Biochem.Z., 329 (1958) 560 - 567
96. SCRIBA, P., SCHNEIDER, S. u. H. HOLZER:
Mechanismus der enzymatischen Freisetzung
von Acetaldehyd aus "aktivem Acetaldehyd"
(α -hydroxyäthyl-2-thiamin-pyrophosphat)
Biochem.biophys.Acta (Amst) 54 (1961) 115 - 120
97. STAT. JAHRBUCH über Ernährung, Landwirtschaft
und Forsten der BRD 1962, S. 175, 176, 205
98. STAUDENMAYER, Th. u. I. FRANKE:
Stoffwechselphysiologische Versuche mit Hefen
für den Biologieunterricht in der Schule.
Praxis d. Naturwiss., 15 (1966) 61 - 65
99. STEINMANN, C.R. u. W.B. JAKOBY: Yeast
aldehyde dehydrogenase.
J.biol.chem., 242, (1967) 5019 - 5023

100. SUOMALAINEN, H. u. E. OURA:
Changes in the decarboxylase activity of
baker's yeast during the growth phase.
Biochim. biophy. Acta (Amst) 31 (1959) 115-124
101. SUOMALAINEN, H.: Changes in the cell
constitution of baker's yeast in changing
growth conditions. Proc. of the Symp. on the
Chemistry and Biochemistry of Fungi and Yeasts,
Dublin 1963 S. 639 - 654
102. TAGUNKOV, Yu, D.: Contents of the
acetaldehyde in wine.
Pishch. Tekhnol. 5, (1966) 52 - 55
zit. Chem Abst. 66 (1967) 99479
103. TANNER, H.: Die Bestimmung der gesamten
schwefligen Säure in Getränken, Konzentraten
und in Essigen.
Mitt. Lebensmittel Unters. Hyg. 54 (1963) 158
104. TANNER, H.: Ein neues Gärhilfsmittel.
Schweiz. Zeitschr. Obst- u. Weinbau 65 (1956) 48
105. THEN, R. u. F. RADLER: Regulation der
Acetaldehydkonzentration im Medium während
der alkoholischen Gärung durch
Saccharomyces cerevisiae.
Arch. Mikrobiol., 72 (1970) 60 - 67
106. TRILLAT, A. u. B. SAUTON:
I. L'aldéhyde acétique est il un produit
normal de la fermentation alcoolique?
II. Rôle des levures dans la formation de
l'aldéhyde acétique en milieux alcooliques.
Ann. Inst. Pasteur, 24 (1940) 302 - 309
107. TROOST, G.: Die Technologie des Weines.
Vlg. E. Ulmer, Ludwigsburg (1954) S. 70

108. TROOST, G.: Das SO_2 -Problem deutscher Spitzenweine. Das Weinblatt, 64 (1970) 400-401
109. VOGT, E.: Weinchemie und Weinanalyse. Vlg. E. Ulmer (1958) S. 144
110. WALLHÖFER, P. u. H.J. REHM:
Beitrag zur Kenntnis der antimikrobiellen Wirkung der schwefligen Säure.
ZUL, 127 (1965) 195 - 206
111. WILES, A.E.: Identification and significance of yeasts encountered in the brewery
J.Inst.Brew., 59 (1953) 265 - 284
112. WILMES, G.: Die Abhängigkeit der SO_2 Toxizität von der Thiaminversorgung.
Proc. 7th Internat. Congr. Nutr. (1966)
113. WUCHERPENNIG, K.:
Unveröffentlichte Mitteilung
114. WÜRDIG, G. u. H.A. SCHLOTTER:
Untersuchungen zur Aufstellung einer SO_2 -Bilanz im Wein.
Deut. Wein-Ztg., 105 (1969) 634 - 642
115. WÜRDIG, G. u. H.A. SCHLOTTER:
Isolierung und Nachweis SO_2 bindender Stoffe im Wein.
Wein Wiss., 24 (1969) 67 - 82

Lebenslauf

Zur Person: Gisela Semmler, geb. Müller,
geb. am 14.8.1945 in Laubach/Oberhess.
als Tochter des Landwirts
Heinrich Müller und seiner
Ehefrau Frida, Gertrud geb. Saalbach

Schul- und
Berufsausbildung: 1952 - 1956 Volksschule in
Ruppertsburg/Oberhess.
1956 - 1965 Gymnasium in Laubach
1965 Reifeprüfung
1965 Hauswirtschaftliches
Praktikum in Nancras
Charente, Frankreich
1965 - 1969 Studium der Hauswirt-
schafts- und Ernährungs-
wissenschaft an der
Justus-Liebig-Universität
in Gießen und an der
Kansas State University in
Manhattan, USA
seit 1969 Doktorandin im Institut
für Weinchemie und Ge-
tränkeforschung der
Hessischen Lehr- und
Forschungsanstalt in
Geisenheim / Rhg.
(Institutsleiter:
Prof. Dr. K. Wucherpfennig)

